

WASHINGTON PORTELA DE SOUZA

ESTUDO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS  
EXCITATÓRIOS SOBRE OS POTENCIAIS EVOCADOS  
CORTICAIS INDUZIDOS POR ESTIMULAÇÃO  
TÁCTIL NO RATO



0.195.689-9

UFSC-BU

Tese de Mestrado apresentada  
ao Departamento de Fisiologia  
da Escola Paulista de Medicina.

SÃO PAULO  
1991

Este trabalho foi realizado no Departamento de Fisiologia, Disciplina de Neurofisiologia e Fisiologia Endócrina, da Escola Paulista de Medicina, sob a orientação do Prof. Dr. Newton Bernardi, durante o Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular, com o auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior).

Ao Dr. Ayrton Roberto de Oliveira,  
pela amizade com que me honrou, pela ajuda  
nos momentos difíceis, sua inesquecível  
ausência.

A Nehemias de Carvalho Portella,  
pela lição de amor e compreensão, nunca  
esquecidas.

Aos meus pais Epitácio e Inalda,  
pelo amor e esforço dedica-  
dos à minha formação.

À minha esposa, Lourdes e aos meus  
filhos, Pedro e Anna, pelo amor, apoio  
e compreensão a mim dedicados.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Newton Bernardi pela orientação na execução deste trabalho, pela atenção, incentivo e contribuição fundamental ao crescimento intelectual e por sua inesgotável paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Jacob Tarasantchi pelo apoio, amizade e condições para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas Candido Geraldo Freitas e Luiz Rodney Mello pelo apoio para a conclusão deste trabalho.

Aos Professores Elias Augusto Limões e Jurandyr D'Avila Assumpção pelo apoio, amizade e ambiente criado para o desenvolvimento deste trabalho, na Disciplina de Fisiologia Endócrina e Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia da Escola Paulista de Medicina.

Ao Prof. Dr. José Américo Bernardes, pelo incentivo e amizade com que contei desde a minha vinda para a Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Prof. José Francisco Danilo de Guadalupe Correa Fletes, do Departamento de Estatística e Computação da Universidade Federal de Santa Catarina, pela orientação no tratamento estatístico deste trabalho.

Ao Dr. Manoel Umbelino de Souza pelo apoio e ajuda no trabalho com o microcomputador.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia da Escola Paulista de Medicina e da Disciplina de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## ÍNDICE

Introdução.....	1
Glutamato.....	9
Aspartato.....	21
Circuitos cerebrais.....	26
Mecanismo neuronal do potencial evocado cortical....	33
Objetivo.....	39
Material e Método.....	42
Animais.....	42
Procedimento cirúrgico.....	42
Registro dos potenciais evocados corticais.....	45
Referências anatómicas.....	46
Coordenadas utilizadas para posicionamento do eletrodo registrador.....	48
Grupos experimentais.....	50
Grupo I - perfusão com aminoácidos.....	50
Grupo II- micro-injeção em camadas profundas..	52
Comprovação histológica.....	54
Análise de dados: procedimento estatístico.....	55
Resultados.....	59
Grupo I - fase curta.....	59
Grupo I - fase longa.....	65
Grupo II- micro-injeção.....	70
Discussão.....	75
Sumário e Conclusões.....	92
Bibliografia.....	94

## INTRODUÇÃO

Praticamente todas as funções do sistema nervoso nos vertebrados superiores e eventualmente em insetos, baseiam-se na transmissão de sinais entre neurônios (Abe *et al.*, 1989; Wafford & Sattelle, 1986). Isso ocorre predominantemente através de sinapses químicas, onde terminações pré-sinápticas liberam substâncias químicas especiais, os neurotransmissores, que provocam alterações na permeabilidade específica da membrana do neurônio pós-sináptico.

A identificação desses neurotransmissores nas diferentes regiões do neuroeixo é de extrema importância para a compreensão, não apenas da sua fisiologia, como também da ação das drogas que sobre eles exercem alguma influência, além da crucial importância na função cerebral, sobretudo na mediação interneural (Ottersen, 1989) e na plasticidade neuronal (Nieoullon, 1990). Atualmente há uma tendência para implicar os aminoácidos neurotransmissores em algumas patologias, notadamente nas isquemias cerebrais (Shiota *et al.*, 1990; Graham *et al.*, 1990; Martiniak *et al.*, 1989; Fujita & Nagata, 1989; Hillered *et al.*, 1990) e doenças mentais (Gross *et al.*, 1990).

Quase todas as substâncias que têm sido seriamente consideradas como neurotransmissores no SNC pertencem a um dos

seguintes grupos: ésteres de colina, monoaminas, peptídios ou aminoácidos (Onodera & Takeuchi, 1990; Masiello *et al.*, 1987; Varga *et al.*, 1987; Beal *et al.*, 1988). Tem sido demonstrado que a acetilcolina e as monoaminas agem como transmissores numa menor proporção de sinapses centrais, enquanto que outras substâncias químicas, como os aminoácidos, atuam em um maior número delas e parecem ser os neurotransmissores predominantes no SNC de mamíferos (Tebecis, 1974; Snyder & Young, 1975; Ottersen, 1989; Rommelspacher, 1990; Maycox *et al.*, 1990; Headley & Grillner, 1990; Onodera & Takeuchi, 1990).

Evidências experimentais da ação dos aminoácidos como neurotransmissores no SNC começaram a se acumular há cerca de trinta e cinco anos atrás, quando foi verificada a capacidade que essas substâncias têm de mudar o estado de excitabilidade do tecido nervoso.

Em 1954, Florey isolou um extrato proveniente do cérebro de mamíferos, denominado de Fator I, o qual possuía efeitos depressivos sobre várias sinapses e tecidos excitáveis de vertebrados e invertebrados. Nesse mesmo ano, Hayashi (1954) relatou uma poderosa ação excitatória do ácido glutâmico aplicado ao córtex cerebral. Em 1957, Bazemore e colaboradores identificaram o ácido gama-amino-butírico (GABA), naturalmente encontrado no tecido nervoso, como o princípio ativo do Fator I. Curtis e Watkins (1960) estudaram os efeitos de vários

aminoácidos sobre a atividade neuronal da medula espinhal em gatos e verificaram que o glutamato e o aspartato apresentavam efeitos excitatórios sobre aquela estrutura, enquanto que o GABA, a taurina e a glicina possuíam uma ação depressora sobre a mesma.

Gradualmente, à medida em que se desenvolveram as investigações sobre a ação dos aminoácidos no SNC, aumentaram, também grandemente as evidências de que esse grupo de substâncias provavelmente teria um papel preponderante na neurotransmissão central. De fato, atualmente muitos autores defendem a idéia de que eles sejam, em termos quantitativos, os principais neurotransmissores nessa região (Tebecis, 1974; Storm-Mathisen, 1977; Watkins & Evans, 1981; Sandberg *et al.*, 1987; Durkin *et al.*, 1988; Curtis, 1989; Kapetanovic *et al.*, 1990).

Todavia, para que uma substância possa ser considerada transmissora em um determinado grupo de sinapses (Davidson, 1976) ela deve satisfazer alguns pré-requisitos, que, basicamente, podem ser agrupados da seguinte maneira:

1. **Presença do transmissor:**— A substância potencialmente considerada como transmissora deve ser encontrada naturalmente nos neurônios dos quais é supostamente liberada;

2. **Presença dos precursores e enzimas de síntese:** Os neurônios devem possuir as substâncias precursoras e os

mecanismos enzimáticos necessários para a síntese do transmissor;

**3. Inativação do transmissor-** O transmissor deve ser inativado imediatamente após sua liberação na fenda sináptica. Essa inativação pode ser enzimática ou por mecanismos de captação ou recaptação específicos;

**4. Mecanismo específico de liberação:** Através de estimulação adequada, o neurotransmissor deve ser liberado e detetado no fluido extracelular na região da sinapse ativada.

**5. Identidade de ação:-** A aplicação do provável transmissor deve exercer um efeito sobre a membrana pós-sináptica de maneira similar ao transmissor natural. Ele deve interagir na membrana pós-sináptica com sítios receptores específicos alterando as propriedades eletroquímicas e a excitabilidade dessa membrana. Além disso, agentes farmacológicos deverão alterar as respostas pós-sinápticas ao provável transmissor e à transmissão do impulso fisiológico de maneira idêntica.

Embora devam ser tomadas cautelas ao se analisar e interpretar o cumprimento desses critérios por algumas substâncias consideradas como possíveis neurotransmissores, eles constituem um ponto de partida bastante razoável para o estudo dos mesmos.

Os aminoácidos livres cumprem várias funções no SNC, participando não apenas da síntese protéica mas também como fonte de energia celular, além de sua participação na transmissão sináptica ao longo de todo o neuroeixo.

Os estudos sobre aminoácidos como neurotransmissores têm sido dificultados em virtude de suas múltiplas funções centrais, podendo a caracterização de uma ação ou outra não ser clara. Assim sendo, a presença e a distribuição de enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos podem muitas vezes estar ligadas a funções metabólicas e não transmissoras (Oja & Kontro, 1987; Meyer & Veh, 1989). Igualmente, sua possível liberação em resposta à estimulação deve estar aberta a interpretação.

Os aminoácidos também têm sido considerados não apenas como neurotransmissores verdadeiros, mas, em certas circunstâncias, como moduladores ou reguladores da atividade neuronal e ainda como substâncias neuroativas em insetos (Abe *et al.*, 1989). O critério para identificação de neuromoduladores assemelha-se àquele apresentado para os neurotransmissores (Oja & Kontro, 1987), todavia, o tempo de sua ação sobre a membrana pós-sináptica é muito mais prolongado em consequência de sua maior permanência na fenda. Assim sendo, seus efeitos são extremamente longos, o que leva a um controle da excitabilidade da membrana pós-sináptica durante a ausência de estímulos (Foster

& Fagg, 1984; Chandler, 1989). Assim sendo, o modo da liberação é crucial para discriminar se uma substância deve ser considerada um verdadeiro neurotransmissor ou um neuromodulador da excitabilidade neuronal. Ela é considerada um neurotransmissor se for liberada em consequência da despolarização da terminação pré-sináptica, levando a uma excitação ou inibição do neurônio seguinte. Por outro lado, se ela somente refletir um estado metabólico da célula da qual se origina e a sua liberação também influenciar a excitabilidade das células vizinhas, tem lugar uma atividade moduladora neuronal. Nem sempre é possível identificar com certeza o tipo de ação do aminoácido em estudo (Foster & Fagg, 1984).

Para que um aminoácido apresente essa ação excitatória parece ser importante a presença de dois grupos carboxílicos terminais (ou de um grupo carboxílico mais um grupo sulfinil ou sulfonil) além de um grupo amina para que haja uma ação excitatória dos aminoácidos. Destes, o ácido glutâmico e o ácido aspártico estão presentes em altas concentrações no SNC dos mamíferos enquanto que os demais são encontrados em quantidades relativamente baixas (Mayer & Westbrook, 1986).

A estreita e confinada relação metabólica entre compostos excitatórios e inibitórios é, realmente, sido notável. Os aminoácidos inibitórios são produtos de descarboxilação dos correspondentes aminoácidos excitatórios - uma relação que

oferece interessantes possibilidade de regulação metabólica da atividade neuronal (Oja *et al.*, 1977).

Curtis e Johnston (1975), descreveram a presença de alguns aminoácidos inibitórios no SNC de mamíferos como a L-alfa-alanina, L-serina, L-cistationina, 3-hidroxi-GABA, ácido L-2,4-diaminobutírico (L-DABA), 4, aminobutirilcolina, ácido imidazol-4-acético e prolina. No entanto, seus efeitos sobre neurônios centrais são relativamente fracos.

Em relação ao córtex cerebral de mamíferos, têm-se acumulado evidências sobre a participação de vários aminoácidos como possíveis neurotransmissores (Krnjevic & Phillis, 1963; Jasper *et al.* 1965; Jasper & Koyama, 1969; Guidotti *et al.*, 1972; Davidson, 1976). Particularmente com o emprego da técnica de microiontoforese, pôde-se observar que certos aminoácidos claramente deprimiam ou excitavam neurônios centrais. Este fato, associado aos outros critérios de identificação de um neurotransmissor, mencionados anteriormente, permitem considerar o ácido glutâmico (Bradford, 1970; Mulder & Snyder, 1974; Cutler & Dudzinski, 1975; Erecinska, 1989; Dunlop *et al.*, 1989; Onodera & Takeuchi, 1989), o GABA (Srinivasan *et al.*, 1969; Iversen *et al.*, 1971; Neal & Bowery, 1979), a taurina (Davison & Kaczmarek, 1971; Clark & Collins, 1976; Collins, 1977a), o aspartato (Takayasu & Dacey, 1989; Levi & Raiteri, 1989; Huether, 1989; Morimoto & Koshland, 1990) e a glicina (Huether, 1989; Takayasu &



Dacey, 1989; Levi & Raiteri, 1989) como possíveis neurotransmissores no SNC.

Todavia, embora haja evidências da participação desses aminoácidos na transmissão cortical, ainda é bastante obscuro o conhecimento a respeito das sinapses em que eles estariam envolvidos.

Dentro dos vários mecanismos neuronais presentes no SNC existem diferentes substâncias responsáveis pela transmissão sináptica e pelas múltiplas atividades dessa região. De acordo com Davidson (1976), ainda não foi observada nenhuma área cerebral de qualquer dimensão na qual todos os neurônios utiliza o mesmo transmissor. Devem existir, também, grupos de células morfológicamente similares na mesma estrutura que liberam diferentes transmissores sinápticos e, ainda, diferentes mediadores podem agir de modo diverso ao produzir efeitos aparentemente semelhantes na mesma estrutura nervosa.

Faremos a seguir, uma breve consideração sobre algumas características dos principais aminoácidos neurotransmissores excitatórios relacionando-os com os critérios anteriormente mencionados para identificação dos transmissores químicos. Antes disso queremos ressaltar o fato de que muito caracteristicamente, a literatura a respeito do aspartato é bem mais escassa do que aquela referente ao glutamato.

## ÁCIDO GLUTÂMICO

### a. Distribuição Central

O ácido glutâmico é um dos mais abundantes aminoácidos livres no SNC dos mamíferos (Cutler & Dudzinsky, 1974; Tallan *et al.*, 1954). Os níveis de glutamato têm sido referidos como particularmente altos no cerebelo, córtex cerebral e tálamo, mas são usualmente altos, tanto quanto outros prováveis neurotransmissores, em todas as áreas do SNC de mamíferos (Battistin *et al.*, 1969; Shank & Aprison, 1970). Walberg e colaboradores (1990), em estudos imunocitoquímicos no complexo vestibular de gatos, encontrou a co-localização de neurônios imunorreativos para aspartato e glutamato, parecendo esta ser a regra e não a exceção. Na retina de rato e galinha, a taurina é achada em níveis mais altos que o glutamato (Pasante-Morales *et al.*, 1972).

A concentração de glutamato no cérebro aparentemente aumenta com a idade em certas áreas, como no córtex cerebral, em que são achados níveis três vezes mais altos no adulto do que em recém-nascidos (Cutler & Dudzinski, 1974). Donzanti e Ung (1990), acharam uma variação na distribuição do glutamato, além de aspartato, serina, glutamina e GABA, com a idade, estudando ratos

de 6 a 20 meses de idade, nas subregiões do estriado.

Na medula espinhal do gato o glutamato tem sido encontrado com uma distribuição compatível com aquela que seria esperada de um transmissor excitatório liberado das fibras da raiz dorsal da medula e também de elementos interneurais (Graham *et al.*, 1967). O glutamato é o único aminoácido que é significativamente mais concentrado na raiz dorsal da medula do que na ventral e é também encontrado em níveis mais altos na porção dorsal da substância branca e cinzenta da medula espinhal do que na porção ventral (Berger *et al.*, 1977; Graham *et al.*, 1967).

O papel do glutamato na medula espinhal, entretanto, parece ser diferente em diferentes espécies. Por exemplo, a secção crônica da raiz dorsal da medula espinhal do coelho, resultando em degeneração das vias primárias aferentes, tem sido reportado como causa de uma substancial redução nos níveis espinhais de glutamato (Jones *et al.*, 1973), embora nenhuma correlação tenha sido achada entre a perda de fibras primárias e terminais da medula espinhal do rato, causadas pelo mesmo procedimento, e os níveis de aminoácidos livres ou a captação de glutamato nesta estrutura (Roberts & Keen, 1974a).

No córtex cerebelar, estudos têm revelado que, quando comparado com níveis normais, o conteúdo de glutamato é significativamente mais baixo nos camundongos mutantes

"staggerer" e "weaver", nos quais existe uma quase completa ausência de células granuladas (McBride *et al.*, 1976). Os autores sugeriram que uma possível interpretação desses resultados seria a de que a concentração do glutamato pode ser maior nas células granuladas do que nas outras células do cerebelo e isto poderia concordar com o fato de que o glutamato talvez seja o possível transmissor excitatório liberado pelas sinapses das células granuladas das fibras paralelas.

Tem sido ressaltado também que, embora a maior proporção do conteúdo de glutamato dos sinaptosomas pareça ser localizada no citoplasma, pelo menos um pequeno compartimento do aminoácido está associado com vesículas sinápticas (De Belleruche & Bradford, 1973; Maycox *et al.*, 1990; Simler *et al.*, 1990). Estes autores observaram, também, que o glutamato e a taurina aparecem como os aminoácidos presentes em quantidades mais significativas na fração purificada de vesículas sinápticas do córtex cerebral do rato.

#### **b. metabolismo no tecido nervoso**

Embora o glutamato seja encontrado em alta concentração no SNC dos mamíferos, relativamente pouco é conhecido acerca de suas vias metabólicas relacionadas com a neurotransmissão.

Uma das possíveis rotas metabólicas do glutamato é como precursor imediato do GABA, sintetizado, se não completamente pelo menos predominantemente, pela descarboxilação do ácido glutâmico, sendo a enzima responsável por esta etapa no metabolismo a descarboxilase do ácido glutâmico - GAD (Davidson, 1976).

A transaminação do GABA com alfa-cetoglutarato, catalizado por GABA-T, poderia ser a fonte de glutamato no cérebro (Davidson, 1976). Fagg e Lane (1979) observaram que o último compartimento de glutamato poderia ser marcado através da sistemática administração de [ $^{14}\text{C}$ ]acetato. Entretanto, tem sido sugerido que a rota mais usada na produção de glutamato no tecido nervoso possivelmente envolva a síntese da glicose (Cotman & Hamberger, 1978; Roberts *et al.*, 1959).

Em estruturas pobremente glutamatérgicas, mas ricamente inervadas por terminais gabaérgicos como no *globus pallidus*, quando comparadas com os valores do *striatum*, têm os níveis de glutamato 2 vezes mais altos que os de GABA no *globus pallidus*, indicando que uma substancial percentagem do reservatório de glutamina é ligado a GABA (Chandler, 1989).

Estudando sinaptossomas do córtex cerebral do rato, Bradford e Ward (1976) observaram que os níveis de glutamina no LCE são mais efetivos que a glicose sozinha na manutenção do compartimento de glutamato presente nas terminações nervosas

isoladas, embora a glutamina pareça ser mais importante para o GABA como neurotransmissor do que é para o glutamato (Paulsen & Fonnum, 1989). Shank e Aprison (1977), estudando o metabolismo da glutamina em cérebros isolados de anfíbios, reuniram evidências que apoiavam o ponto de vista de que o compartimento transmissor de glutamato é mantido e regulado, em parte, via biossíntese da glutamina.

A compreensão das vias metabólicas do glutamato no tecido nervoso torna-se muito mais complexa pela aparente diferença entre as rotas envolvidas na formação do glutamato no cérebro imaturo e no adulto (Donzanti & Ung, 1990; Pogson *et al.*, 1989).

Van der Berg (1970), observando que glucose não é tão eficiente como precursor no cérebro de camundongo de 10 dias quanto no cérebro adulto, sugeriu que o sistema nervoso imaturo talvez use preferencialmente outras substâncias em vez de glicose, para a formação do glutamato.

Tem sido observado o que glutamato radioativo aplicado no tecido nervoso é rapidamente metabolizado, principalmente para glutamina (Roberts & Keen, 1974b; Van der Berg *et al.*, 1975). Esta conversão de glutamato em glutamina, catalizada pela glutamina sintetase, pode ser uma das principais rotas para o catabolismo do glutamato transmissor, mas o caminho metabólico do compartimento do glutamato particularmente associado com a transmissão nervosa não está bem claro.

Mais recentemente, evidências têm-se acumulado no sentido de que o metabolismo do glutamato transmissor envolve um processo de reciclagem pelo qual a captação do glutamato transmissor é feita pela glia, onde é convertido em glutamina, a qual se difunde para as terminações nervosas onde é utilizada como precursora de glutamato (Bradford, 1977; Hamberger *et al.*, 1978; Paulsen & Fonnun, 1989).

### **c. captação**

Desde há muito se sabe que o tecido cerebral pode ativamente acumular glutamato a partir do meio circulante (Stern *et al.*, 1949). Foi observado, ainda, que o transporte de glutamato para o interior do tecido ocorre contra um gradiente de concentração e também que, embora o aminoácido tenha sido acumulado e retido pelas camadas cerebrais, muitas moléculas difundem-se para o meio.

Em experimentos há muito realizados com fatias cerebrais de ratos, Blasberg e Lajtha (1966) já haviam observado uma mútua inibição competitiva na captação de glutamato e aspartato. Os autores também achavam que poderia haver mais de um sítio de transporte de aminoácidos no cérebro, mas não um para cada um deles e, também, que um aminoácido poderia ter afinidade

por mais de um sítio de transporte. Em adição à alta afinidade por qualquer sítio primário, um aminoácido poderia ter uma baixa afinidade por outro.

Estudos de acumulação de aminoácido em sinaptossomas de córtex cerebral e de medula espinhal de ratos têm mostrado que o glutamato, assim como o aspartato, têm mecanismos de baixa e de alta afinidade em ambas as regiões (Logan & Snyder, 1971). Também em fatias de medula espinhal de gatos a captação de glutamato parece ser mediada cineticamente por dois sistemas distintos, um de baixa e outro de alta afinidade (Balcar & Johnston, 1973).

Estudos feitos em córtex e tálamo de rato indicam, entretanto, que a maior captação de glutamato extracelular parece ser mais glial que neuronal (McLennan, 1976). Uma dependência à temperatura e ao  $\text{Na}^+$  no mecanismo de captação de alta afinidade foi também encontrada em cultura de células gliais de hamster (Balcar *et al.*, 1977).

No cerebelo de rato, um mecanismo de alta afinidade para o glutamato tem sido referido em preparações purificadas de glomérulos (Wilson *et al.*, 1976). Young e colaboradores (1974) demonstraram que em hamster com hipoplasia cerebelar induzida por vírus, que apresentavam uma perda seletiva de mais de 95% da população de células granulares cerebelares, a captação de alta afinidade de glutamato e aspartato foi reduzida em 70%. Também houve um decréscimo de 43% no nível do glutamato endógeno, mas



não do aspartato, reforçando a idéia de que o glutamato é o maior transmissor natural das células granulares cerebelares.

#### **d. liberação**

Já há muito é sabido que a taxa de liberação de glutamato do córtex cerebral de rato tem sido reportada como sendo mais baixa durante o sono que durante o alerta (Jasper *et al.*, 1965), e um incremento seletivo de 3 a 7 vezes no efluxo do glutamato foi observado durante a estimulação reticular (Jasper & Koyama, 1969). Este massivo aumento seletivo no efluxo de glutamato sugere que este aminoácido possa estar envolvido direta ou indiretamente na transmissão química da ativação do sistema retículo cortical.

Estudos feitos com sinaptossomas de córtex cerebral de rato têm mostrado um notável aumento da liberação de glutamato induzida por estimulação elétrica (Bradford, 1970). Um aumento  $\text{Ca}^{2+}$  -dependente no efluxo do glutamato foi observado também em sinaptossomas da medula espinhal e medula oblonga, conseqüentes à estimulação elétrica ou por  $\text{K}^+$  (Osborne *et al.*, 1973; Paulsen & Fonnun, 1989).

No efluxo de glutamato marcado tem sido observado um incremento por estimulação elétrica em medula espinhal

hemiseccionada de anfíbio (Roberts & Mitchell, 1972), e em fatias de córtex cerebral de rato (Cutler & Dudzinsky, 1975).

Mulder e Snyder (1974), estudando a liberação de aminoácidos endógenos do córtex cerebral e de fatias medulares de rato, observaram que a liberação induzida por  $K^+$  de glutamato, em ambas as regiões, foi notavelmente diminuída em meio livre de  $Ca^{2+}$ .LS2

Estudos "in vivo" feitos no núcleo da coluna dorsal do rato, mostraram um consistente aumento  $Ca^{2+}$ -dependente de glutamato marcado e endógeno conseqüente à estimulação elétrica direta (Roberts, 1974). Um aumento do efluxo de glutamato endógeno dependente de  $Ca^{2+}$ , induzido por estimulação elétrica e por  $K^+$ , tem sido observado "in vivo" no córtex cerebral do rato (Clark & Collins, 1976; Foster & Fagg, 1984).

Há evidências de que as células gliais têm um papel importante na síntese e na inativação do glutamato e aspartato: Paulsen *et al.* (1988), descreveram a diminuição da liberação "in vivo" do glutamato e do aspartato após tratamento com fluorocitrato em células gliais de ratos. Em oligodendrócitos e astrócitos de culturas primárias dissociadas de cérebros de ratos recém-nascidos, Reynolds e Herschkowitz (1986), utilizando autorradiografias, mostraram que estas células acumulam glutamato e aspartato e possuíam um mecanismo de transporte destes aminoácidos e que são rapidamente metabolizados, demonstrando que

a glia do SNC pode estar envolvida na modulação da excitabilidade neuronal considerando sua capacidade para acumular e metabolizar aminoácidos neuroativos. Paulsen e Fonnun (1989) produziram um efluxo de glutamato, dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , evocado por  $\text{K}^+$  no neostriatum de ratos anestesiados e isto foi considerado uma resposta a partir do reservatório do transmissor.

Outrossim, evidências implicam a substância P [SP(1-11)] como neurotransmissor ou neuromodulador de informações nociceptivas, sendo isto um aumento das evidências de que glutamato e aspartato podem agir como neurotransmissores nociceptivos (Skilling *et al.*, 1990).

Em culturas primárias de neurônios corticais o glutamato provoca uma liberação de somatostatina endógena de uma maneira dose-dependente. Os dados referem uma indicação de que a liberação da somatostatina é induzida essencialmente através de receptores do subtipo N-metil-D-ácido aspártico (NMDA) (Tapia-Arancibia & Astier, 1989).

#### **e. ação central**

A primeira referência da ação do glutamato no tecido nervoso central foi feita por Hayashi (1954), que observou o poderoso efeito provocado pela aplicação local do aminoácido na

superfície cortical exposta do cérebro.

A administração iontoforética de glutamato tem sido estudada em várias áreas centrais, mostrando que neurônios susceptíveis aos efeitos excitatórios dos aminoácidos podem ser encontrados largamente por todo o SNC. Por exemplo, tem sido visto que o glutamato, pronta e poderosamente, excita células nervosas no núcleo vermelho, medula espinhal, núcleo cuneato e córtices cerebral e cerebelar (Davis & Huffman, 1969; Gahwiler, 1976; Galindo *et al.*, 1967; Krnjevic & Phillis, 1963; Stone, 1973), e recentemente encontraram-se evidências de uma ação moduladora sobre a prolactina (Carlson *et al.*, 1989; Dunlop *et al.*, 1989; Maes *et al.*, 1989).

Entretanto, embora apresentando ampla ação excitatória, o glutamato não mostra estes efeitos quando aplicado em várias estruturas. McLennan e colaboradores (1976) observaram que, no tálamo ventral de felinos, neurônios profundamente situados foram muito sensíveis ao glutamato, ao mesmo tempo que células mais superficiais foram só fracamente excitadas pelo aminoácido. Tem sido também referido que o glutamato não só não excita, mas muitas vezes inibe células mitraais do bulbo olfatório (Nicoll, 1971).

Tem sido observado tanto "in vivo" como "in vitro", que a taxa de disparo da atividade espontânea de neurônios cerebelares foi marcadamente aumentada pela aplicação iontoforética de glutamato (Geller & Woodward, 1974; Kawamura &

Provini, 1970). Pela aplicação de glutamato foi também mostrado que acontece um aumento da média da taxa de disparo de células de Purkinje de rato "in vivo" (Gahwiler, 1976). Estudos iontoforéticos feitos em córtex cerebelar de porco da Índia revelou que, embora os corpos celulares sejam também sensíveis, os dendritos das células de Purkinje são muito mais sensíveis à ação excitatória deste aminoácido que o corpo celular (Chujo *et al.*, 1975), apoiando a possibilidade de que o glutamato seja um poderoso transmissor excitatório liberado dos granulócitos terminais sobre os dendritos das células de Purkinje.

## ASPARTATO

### a. distribuição central

Já há muito tempo é sabido que os níveis de aspartato no tecido nervoso são bastante elevados, constituindo-se ele, depois do glutamato, no aminoácido livre encontrado em maior quantidade no SNC dos mamíferos, onde sua distribuição é bastante ampla, sendo a região do mesencéfalo uma das que o contém em mais alto nível (Battistin *et al.*, 1969; Di Lauro *et al.*, 1982; Singh & Malhotra, 1962). É importante notar, todavia, que sua distribuição difere daquela do glutamato, indicando não ser a sua presença apenas uma consequência metabólica da presença do glutamato e, sim, uma indicação de alguma função específica do aspartato nas regiões onde ele é naturalmente encontrado (Graham *et al.*, 1967).

### b. metabolismo

A exemplo do glutamato, o aspartato é um aminoácido

extremamente abundante no cérebro dos mamíferos, com 114mg do aminoácido por cada 100g de tecido úmido (Tallan *et al*, 1954), e não é encontrado apenas no tecido cerebral, sendo provavelmente encontrado no SNC um compartimento relacionado com a neurotransmissão. Por essa razão seu metabolismo não está apenas ligado, como o GABA, à neurotransmissão (Erecinska, 1989; Takayasu & Dacey, 1989; Carlson *et al.*, 1989; Shiota *et al.*, 1989; Busija & Leffler, 1989), mas, também, a outras atividades metabólicas.

O aspartato é sintetizado a partir da glicose e a parte final da via é provavelmente pela transaminação do ácido oxalacético e ácido glutâmico pela aspartato aminotransferase (algumas vezes referida como glutamato oxalacetotransferase).

O aspartato é formado rapidamente em fatias de córtex cerebral *in vitro* (Harrison & Simonds, 1985). Ao menos em condições experimentais, parte desta síntese pode ocorrer tanto em terminais nervosos quanto em corpos celulares (Paulsen & Fonnun, 1989; Dunlop *et al.*, 1989; Carlson *et al.*, 1989; Yingcharoen *et al.*, 1989). Bradford e colaboradores (1969), em terminações nervosas de fatias cerebrais e frações de sinaptossomas incubadas por seis minutos em meio contendo glicose marcada com carbono 14, observaram que sinaptossomas e fatias cerebrais mostraram uma respiração linear e incorporaram radioatividade no CO<sub>2</sub>, lactato, aspartato, glutamato, alanina e

GABA. As fatias cerebrais produziram quantidades similares de aspartato como os sinaptossomas mas três vezes mais glutamato, oito vezes mais glutamina e o dobro de GABA. Com glutamato no meio de incubação em lugar da glicose, tanto sinaptossomas como as fatias cerebrais produziram aspartato, alanina e GABA. As fatias corticais também produziram consideráveis quantidades de glutamina, indicação do ativo metabolismo de glutamato. Isto parece indicar que o aspartato, assim como glutamato, é sintetizado, ao menos em parte, em terminais nervosos e pode estar associado com processos de transmissão neural.

### **c. captação**

Embora tenha sido demonstrada a existência de mecanismos de captação com alta afinidade para o aspartato (Balcar & Johnston, 1973; Logan & Snyder, 1971), e seja muito provável que, como no caso do glutamato, a sua captação seja levada a cabo pelas células envolvidas na sua liberação e por células da glia próximas, não se sabe se existem mecanismos de inativação distintos para os dois aminoácidos ou se ambos partilham do mesmo (Balcar *et al.*, 1977; Bennett *et al.*, 1973; Bradford, 1986).



#### **d. liberação**

São comparativamente escassos os estudos que demonstram a liberação de aspartato no tecido nervoso. Há todavia, evidências de que a liberação  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente de aspartato pode ser induzida tanto por estimulação elétrica como por altas concentrações de  $\text{K}^+$ , em sinaptossomas de diferentes regiões do neuroeixo (Bradford, 1970, 1986; Ereciska *et al.*, 1987; Osborne *et al.*, 1973; Paulsen & Fonnun, 1989; Dunlop *et al.*, 1989; Holopainen, & Kontro, 1990), sugerindo seu possível envolvimento no processo de transmissão sináptica central.

#### **e. ação central**

Os efeitos excitatórios da aplicação de aspartato em diversas regiões do SNC, conhecida há longo tempo (Curtis & Watkins, 1960; Krnjević & Phillis, 1963), muito se assemelham aos do glutamato, originando a dúvida a respeito da existência ou não de diferentes receptores para ambos (Davidson, 1976; Nistri & MacDonald, 1978). Atualmente são conhecidos vários grupos de receptores para glutamato e aspartato, farmacologicamente identificados, mas cujo significado fisiológico ainda não está suficientemente esclarecido (Bradford, 1986; Foster & Fagg,

1984). Em tecido sinaptosomal (P2) Debler e Lajtha (1987) observaram apenas um sistema de transporte de alta afinidade comum a aspartato e glutamato.

Na medula seccionada de ratos foi pequeno o efeito nos níveis de aspartato, porém a oclusão unilateral da artéria espinhal mostrou um decréscimo, no quadrante operado, dos níveis de aspartato, glutamato e GABA, reforçando a idéia de que estes aminoácidos funcionam como neurotransmissores nos interneurônios da medula espinhal (Fugita & Nagata, 1989).

Martiniak e colaboradores (1989), após isquemia na medula espinhal pela ligação da aorta abdominal em coelhos, observaram um aumento na concentração de aspartato e GABA no corno ventral e um aumento na concentração de aspartato, glicina e GABA no corno dorsal. Outros autores referem ainda diferentes níveis de aspartato e glutamato após isquemia provocada (Fujita & Nagata 1989; Martiniak *et al.* 1989; Graham *et al.* 1990).

Erecinska e Troeger (1986), estudando o aspartato intercambiável em preparações sinaptossomais de ratos mostraram uma exigência de NaCl externo, tendo havido um pequeno aumento de potássio externo. A demonstração da troca como parte do processo de transporte é uma evidência de que o influxo e o efluxo de aminoácidos neurotransmissores ocorrem por uma membrana através de transporte reversível. Um pouco depois, Erecinska e Nelson (1987) mostraram que preparações sinaptossomais metabolicamente

ativas de cérebro de rato acumulavam aminoácidos neurotransmissores e que o gradiente transmembrânico era conseguido com o mesmo sistema de transporte para o aspartato e o glutamato.

### CIRCUITOS CEREBRAIS

O córtex somato-sensorial ocupa o terço médio da extensão rostrocaudal dos hemisférios cerebrais de roedores. Na dimensão mediolateral, ele se estende da linha média e termina na fissura rinal (Jones & Powell, 1973).

A distribuição dos tipos celulares corticais não é aleatória ao longo do eixo normal à superfície do córtex, de modo que a segregação relativa por profundidade leva a uma estratificação que se manifesta nas camadas corticais. Como nas outras regiões neocorticais, o córtex somato-sensorial está dividido em seis camadas (Zimmermann, 1978).

Através dos estudos de Cajal (1911) e Lorente de Nó (1922, 1938) foram observados vários tipos de células corticais. Lorente de Nó descreveu vinte tipos neuronais diferentes no córtex somato-sensorial de camundongo. Esses tipos foram classificados de acordo com diversos critérios, como a localização laminar do corpo celular do neurônio, sua ramificação dendrítica e sua trajetória axonal. Os neurônios dessa região

cortical, como em todas as regiões do neocórtex, podem ser divididos em três tipos gerais: neurônios piramidais, neurônios estrelados e neurônios fusiformes. Essa classificação é baseada principalmente na morfologia dendrítica e na sua distribuição axonal. A grosso modo, a distribuição axonal das células estelares é relativamente restrita, enquanto as das células piramidais se estende a longas distâncias e as das células fusiformes se dá na camada VI, freqüentemente projetando-se para fora do córtex. Além disso, cada um desses três tipos celulares tem uma área distinta de distribuição, sendo restritos para uma camada cortical específica.

As camadas corticais são definidas da seguinte forma, da superfície da pia mater para o interior do neuroeixo:

Camada I ou molecular - Essa camada possui ramos terminais dos dendritos apicais das células piramidais das camadas II, III, V e VI, alguns axônios ascendentes corticais e axônios de aferentes corticais inespecíficos.

Camada II ou granular externa - Contém grande número de células piramidais cujos dendritos basais se ramificam nessa camada e os apicais se dirigem à camada I. Seus axônios ramificam-se repetidamente e terminam nas proximidades das células das camadas V e VI. Por outro lado, essa camada recebe axônios provenientes das células granulares da camada IV, fibras de associação e colaterais recorrentes de axônios das células piramidais das

camadas mais profundas.

Camada III ou das células piramidais - Apresenta células piramidais maiores do que a camada II. Seus dendritos apicais ramificam-se na camada II e terminam na camada I, enquanto que os dendritos basais se expandem nessa mesma camada III. Eferências desta camada terminam principalmente nas camadas V e VI, sendo que alguns abandonam o córtex como fibras de associação ou de projeção. Por outro lado, essa camada recebe aferências talâmicas inespecíficas enquanto que as células da porção inferior recebem aferências talâmicas específicas.

Camada IV ou granular interna - Os dendritos das células estreladas ramificam-se no interior dessa camada e recebem conexões sinápticas dos terminais axonais dos eferentes talamocorticais específicos. Também são encontrados aí dendritos apicais de células piramidais localizadas em camadas profundas. Alguns axônios dessas células estreladas terminam nas camadas I a III formando um cesto ao redor das células piramidais e lembrando as células em cesto do cerebelo. A maioria desses axônios, porém, desce em direção às camadas V e VI.

Camada V ou de células ganglionares - Possui grandes células piramidais com dendritos apicais que atingem a camada I, onde terminam em forma de escova enquanto que os dendritos basais e os colaterais dos ramos ascendentes estão distribuídos exclusivamente dentro dessa camada. Os axônios eferentes são

geralmente fibras de associação e de projeção, geralmente possuindo ramos colaterais recorrentes que ascendem e terminam nas camadas II, III e até na camada I.

Camada VI ou fusiforme - Contém células em forma de fuso. Os dendritos podem-se ramificar horizontalmente e as maiores sobem até a camada I. Seus axônios geralmente se projetam para fora do córtex. LS2

Os principais circuitos neuronais no córtex cerebral estão esquematizados na figura 1. As aferências talamocorticais específicas excitatórias são provenientes do núcleo ventral posterior do tálamo dorsal e terminam na porção inferior da camada III e, principalmente nas células estreladas da camada IV, podendo terminar ainda em alguns dendritos apicais verticalmente orientados, provenientes das células piramidais da camada V. As células estreladas, por sua vez, fazem contato sináptico com o corpo celular da célula piramidal e, principalmente, com seu dendrito apical que sobe em direção à superfície.

Do ponto de vista funcional, o córtex deve ser considerado composto por cadeias complexas de interneurônios, os quais estão interpostos entre a entrada e a saída de uma coluna vertical de células que se estendem através de todas as camadas celulares. A aferência inicial para essa cadeia ganha um acesso rápido de algumas células estreladas da camada IV, descendo para os elementos neurais eferentes das camadas V e VI, através de

axônios descendentes de células estreladas e, por outras vias, sobe para as células piramidais das camadas II e III.

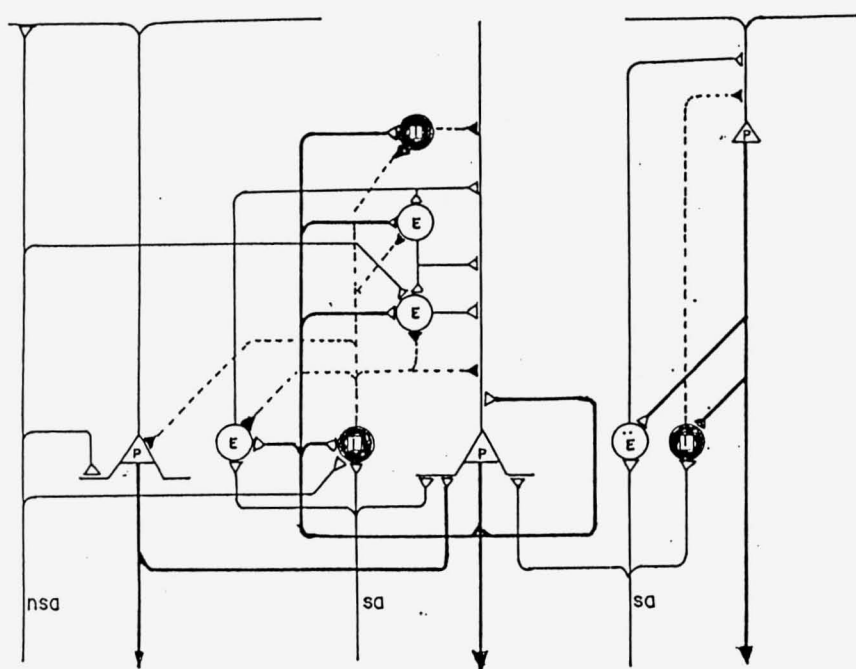


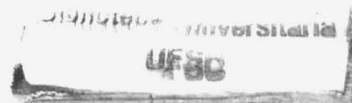
Figura 1 - Esquema das conexões entre os diversos grupos celulares do córtex cerebral do rato. Células com corpo celular triangular (células piramidais - P) e células com corpo celular circular (células estreladas - E: excitatórias e I: inibitórias). nsa - aferentes não específicos; sa - aferentes específicos, provenientes do núcleo ventral posterior do tálamo dorsal.



Os impulsos que caminham pelos neurônios eferentes influenciarão a atividade das células das camadas mais externas do córtex através de colaterais recorrentes tanto excitatórios quanto inibitórios que se encontram distribuídos de forma padronizada. É provável que os aferentes de cada coluna, através de inibição recorrente, deprimam a atividade dos neurônios das colunas adjacentes, contribuindo assim para a segregação vertical da atividade neuronal cortical (Mountcastle, 1976).

Fibras aferentes de origem talâmica, cuja localização exata no tálamo ainda não é conhecida e que podem surgir a partir do sistema talamocortical inespecífico, fazem sinapse com células piramidais e estelares com ação sináptica excitatória ou inibitória, localizadas em todos os níveis do córtex cerebral.

A inibição dos neurônios do trato piramidal pode ocorrer por estimulação química das células esteladas localizadas nas adjacências ou ainda através de vias colaterais de axônios piramidais, os quais, provavelmente, fazem sinapse com células esteladas. Outros resultados indicam que colaterais recorrentes das células piramidais podem excitar outras células corticais através de uma conexão direta (Mountcastle, 1976).



## MECANISMO NEURONAL DO POTENCIAL EVOCADO CORTICAL

Quando se realizam registros das diferenças de potencial entre um eletródio colocado na superfície cortical e um segundo colocado à distância, a preparação representa um caso especial de registro em um meio condutor grande contendo elementos ativos, explicáveis apenas parcialmente pela teoria clássica do condutor de volume. É provável que os potenciais de ação nos axônios contribuam pouco para os registros corticais superficiais, porque, na medida em que eles ocorrem assincronicamente em um número grande de axônios orientados de forma variada em relação à superfície cortical, a influência resultante sobre um eletródio superficial será zero. Uma exceção é o caso especial em que um grande número de axônios talamocorticais é ativado simultaneamente pela estimulação elétrica dos núcleos talâmicos ou de suas vias aferentes. Esses potenciais podem ser positivos ou negativos, e podem ocorrer imediatamente abaixo do eletródio ou a alguma distância dele; uma variação de potencial registrada na superfície é a medida do produto intensidade versus resistência (IR) entre o eletródio da superfície cortical e o eletródio distante, produzido pelos fluxos extracelulares de corrente associados aos potenciais pós-sinápticos locais.

Qualquer variação elétrica registrada na superfície

cortical deve-se a um arranjo simétrico e ordenado de alguma classe de células no interior do córtex e as células piramidais corticais parecem ser as candidatas mais prováveis. Seus longos dendritos apicais estão ordenados paralelamente entre si e perpendicularmente à superfície cortical. As variações de potencial em uma das partes dessa célula em relação às outras criam campos abertos de fluxo de correntes que podem ser detectados na superfície do córtex. As células granulares, por outro lado, parecem não contribuir de forma substancial para os registros de superfície. Suas árvores dendríticas são espacialmente restritas e, arranjam-se radialmente em torno dos corpos celulares de modo que as diferenças de carga entre os dendritos e o corpo celular produzirão campos fechados de fluxo de corrente, que totalizarão zero quando ocorridos a uma distância relativamente grande da superfície cortical (MacKay, 1970).

Creutzfeldt e colaboradores (1966) relataram que potenciais pós-sinápticos excitatórios (despolarizadores) em elementos neurais localizados nas proximidades da superfície cortical geralmente induzem negatividade no registro cortical e, por outro lado, quando localizados mais profundamente no córtex, eles geralmente induzem positividade nesse registro. Por outro lado, potenciais pós-sinápticos inibitórios (polarizadores) induzem geralmente efeitos opostos no registro superficial. Em

circunstâncias bem definidas, essas correlações parecem ser bastante fortes, como quando se registra o potencial evocado em resposta à estimulação sensorial, ou à estimulação do nervo aferente ou, ainda, estimulando núcleos talâmicos componentes da via aferente. Essa resposta, no córtex sensorial primário, corresponde a uma onda positiva brusca superficial, de latência relativamente pequena, seguida de uma onda negativa lenta superficial (Creutzfeldt *et al.*, 1966; Schwartz, 1982). Essa resposta está correlacionada com a ação sináptica despolarizadora nas camadas profundas do córtex e com potenciais pós-sinápticos despolarizadores mais lentos nos elementos corticais mais superficiais. Potenciais pós-sinápticos retardados ou prolongados produzem ondas secundárias mais complexas no potencial evocado (Purpura, 1970; Creutzfeldt *et al.*, 1966).

A amplitude da primeira onda positiva da resposta evocada cortical tem sido considerada como proporcional à descarga das células da via talamocortical e pode ser considerada um estado estimativo da intensidade da descarga talamocortical aferente (Angel *et al.*, 1980), enquanto que a onda negativa está correlacionada com a difusão da despolarização para as camadas mais superficiais do córtex (Creutzfeldt, *et al.* 1966).

Por intermédio de registros feitos em diferentes profundidades, pode-se ter uma idéia mais adequada dos fenômenos ocorridos no córtex. Assim, ao se introduzir um microeletrodo

cada vez mais profundamente, a forma da onda registrada vai mudando até que, em determinada altura, o evento primário é uma onda negativa inicial com latência correspondente à onda positiva de superfície (Li *et al.*, 1956). Quando isso ocorre, o eletródio se encontra próximo da região que corresponde às áreas onde terminam as eferências talâmicas específicas na parte inferior da camada III e na camada IV, esta última apresentando um número de células estreladas relativamente elevado. Assim, quando uma descarga aferente pós-sináptica despolariza principalmente as células estreladas, onde surgirá uma região de negatividade profunda que pode ser registrada sob forma de onda positiva na superfície, em consequência do dipolo formado entre esta e o local de chegada dos impulsos nervosos.

A figura 2 representa uma tentativa de esquematizar esses eventos: à esquerda, indica-se uma série de possíveis ligações sinápticas, sendo  $T_1$  a terminação aferente primária nas camadas III e IV fazendo contato com um dendrito apical de uma célula piramidal profunda. A ativação dessa região provocará, na superfície, o aparecimento de uma onda positiva. Essa fibra aferente, ativa, então, neurônios do tipo II de Golgi ( $T_2$ ), provocando, por sua vez, ativação de regiões cada vez mais superficiais dos dendritos apicais, produzindo uma propagação ascendente da negatividade que acaba por conduzir a uma inversão do potencial de superfície. Amassian e Weiner (1966)

demonstraram que esse deslocamento da atividade até a superfície pode apresentar retardos sinápticos.

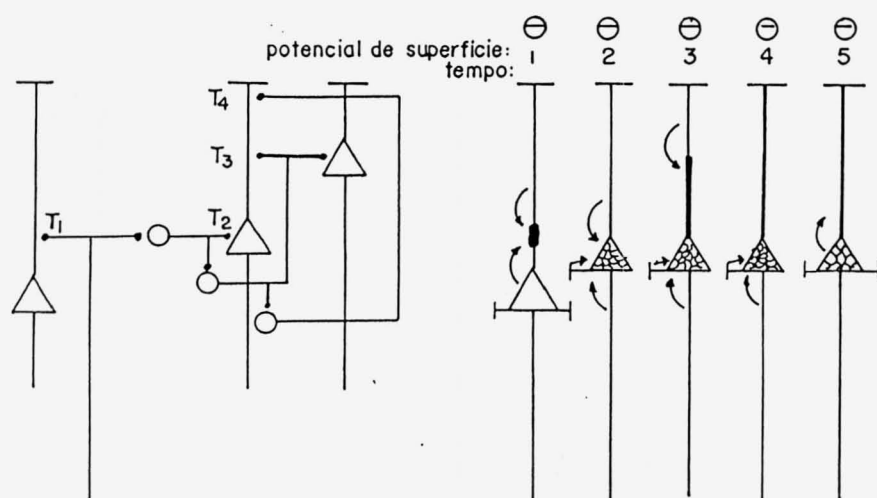


Figura 2 - Esquema de eventos para obtenção do potencial evocado: série de possíveis ligações sinápticas, sendo T1 a terminação aferente primária nas camadas III e IV fazendo contacto com um dendrito apical de uma célula piramidal profunda. A ativação dessa região, provocará na superfície, o aparecimento de uma onda positiva. Essa fibra aferente, ativa, então, neurônios do tipo II de Golgi (T2), provocando por sua vez, ativação de regiões cada vez mais superficiais dos dendritos apicais, produzindo uma propagação ascendente da negatividade que acaba por conduzir a uma inversão do potencial de superfície.

## OBJETIVO DO PRESENTE TRABALHO

Os aminoácidos parecem constituir, em termos quantitativos, importante grupo de neurotransmissores no sistema nervoso central de mamíferos (Snyder & Young, 1975; Fagg & Lane, 1979), e um dos requisitos propostos para considerar uma substância como possível neurotransmissor está relacionado aos efeitos da aplicação de possíveis mediadores sobre a transmissão num grupo de sinapses sob investigação.

A organização relativamente uniforme, laminada e colunar do neocórtex, de localização superficial e, portanto de fácil acesso, sem interferência no tecido nervoso, aliada ao razoável conhecimento dos circuitos neuronais que o compõem e à localização relativamente restrita dos impulsos aferentes provenientes de diferentes partes do neuroeixo, tornam aquela estrutura particularmente adequada ao estudo de possíveis neurotransmissores centrais.

No presente projeto foram investigados os efeitos da aplicação tópica, no córtex cerebral exposto de ratos anestesiados, dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, sobre os potenciais evocados corticais induzidos por estimulação tátil.

O razoável conhecimento dos locais de chegada dos



impulsos ao córtex, como consequência de estimulação sensorial, e do significado das diferentes ondas que compõem o potencial evocado captado na sua superfície, permitem uma análise sobre a participação desses aminoácidos na transmissão cortical, embora este estudo não seja suficiente para demonstrar qual o grupo ou grupos de sinapses em que essas substâncias estariam envolvidas.

Pela própria natureza dos requisitos essenciais para a identificação de neurotransmissores centrais pode-se perceber que sua caracterização segura demanda estudos de caráter multidisciplinar que normalmente envolvem diferentes laboratórios, grupos de pesquisadores com diferentes preparo e métodos diversos de abordagem do problema. Assim sendo, os critérios utilizados para a indentificação dos mediadores têm sido lentamente satisfeitos pela soma de trabalhos isolados desenvolvidos por diferentes grupos de investigação. Ainda assim, são relativamente raros os neurotransmissores identificados com segurança e relacionados a certos grupos sinápticos centrais, como é o caso, por exemplo, do GABA liberado pelas células de Purkinge no cerebelo. Portanto, toda pesquisa acerca dos neurotransmissores representa, apenas e obrigatoriamente, o cumprimento de mais uma etapa no caminho para a sua identificação, sendo que nenhuma investigação isolada é conhecida que tenha conseguido satisfazer a todos os requisitos indispensáveis para a caracterização dos mediadores químicos.

Assim sendo, o presente projeto visa contribuir para o esclarecimento do possível envolvimento de aminoácidos excitatórios nos grupos sinápticos relacionados às aferências corticais, através do estudo das alterações por eles causadas nos potenciais evocados induzidos por estimulação periférica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ANIMAIS

Foram utilizados em nossos experimentos ratos albinos machos da raça Wistar, com pesos que variavam de 220 a 410 gramas. Todos os animais eram provenientes do Biotério Central da Escola Paulista de Medicina e permaneciam a uma temperatura ambiente de 23°C a 25°C, com ciclos de claro-escuro de 11 e 13 horas. Esses animais recebiam água e ração para roedores da marca "Purina", fornecidas "ad libitum".

### PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais eram anestesiados com uma solução de uretana a 25%, injetada intraperitonealmente na dose de 0,5 ml/100 gramas de peso corporal. A seguir, procedia-se à raspagem de todo o pelo da cabeça e porção dorsal do pescoço do animal, quando então era injetada em todo o tecido subcutâneo dessas regiões uma solução de xilocaína com 2% de adrenalina, com o propósito de, além de anestesiá-lo localmente, auxiliar na diminuição do sangramento dos tecidos afetados pela cirurgia.

A seguir, fixava-se a cabeça do animal a um aparelho estereotático (David Kopf Instruments) e fazia-se uma incisão

longitudinal na pele, acompanhando a sutura sagital, desde alguns milímetros atrás da linha binocular, seguindo por todo o crânio até atingir a porção superior da região cervical (figura 3).

A pele e a musculatura eram cuidadosamente afastadas dos ossos e rebatidas, deixando à mostra as faces dorsal e parte das laterais do crânio até a altura das arcadas zigomáticas. O perióstio da superfície dorsal era afastado e um orifício de aproximadamente 3mm de diâmetro era aberto no osso parietal direito com uma perfuratriz elétrica (Dremel 260). A partir do orifício, para ampliar a abertura atingindo inclusive parte do osso frontal, utilizava-se uma goiva.

Os animais cuja superfície cortical deveria ser submetida a superfusão com solução salina ou com aminoácidos tinham, também, a duramater cuidadosamente removida de maneira a expor a superfície pial numa extensão suficiente para ser fixada a câmara de superfusão. Assim, nesse grupo, após o animal ter sido preparado e fixado ao estereotáxico, ele era colocado dentro de uma gaiola de Faraday para prevenir interferências externas durante o registro da atividade elétrica.

Durante todo o experimento a temperatura retal dos animais era monitorada e mantida em  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , por meio de uma mesa térmica onde o animal permanecia durante todo o experimento.

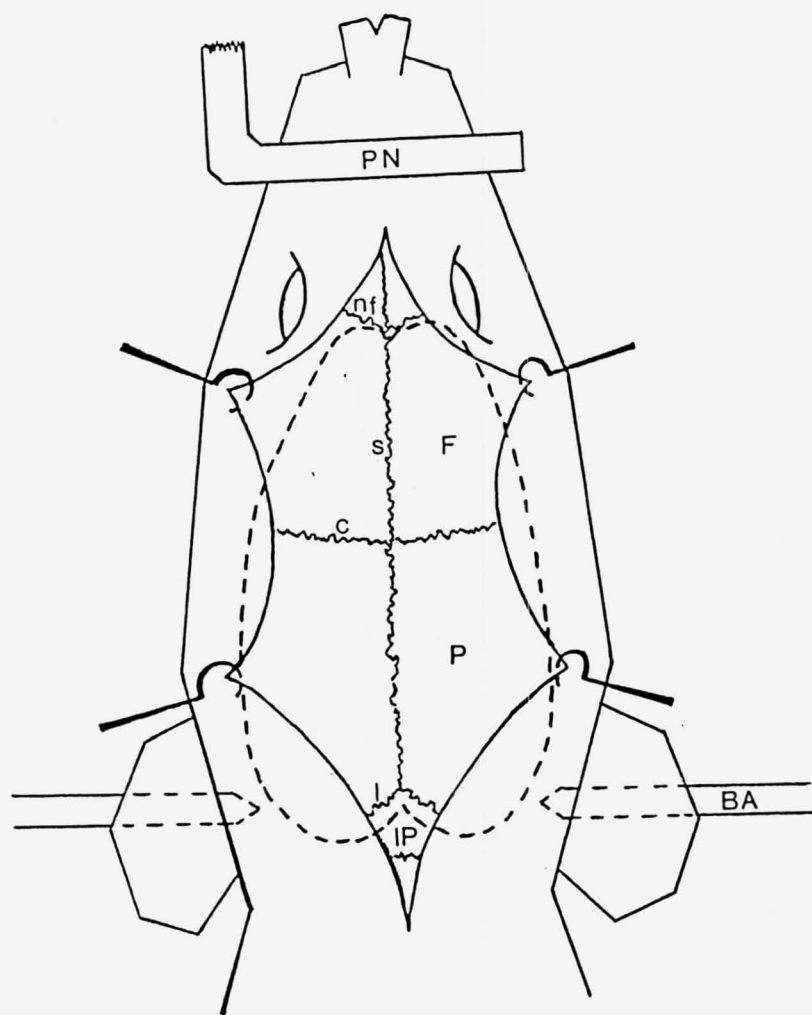


Figura 3 - Vista esquemática superior da cabeça do rato com a pele rebatida, preparada para trepanação, mostrando a posição relativa entre o cérebro (linha tracejada) e as suturas cranianas. PN: presilha nasal, BA: barra auricular.

Ossos - F: frontal, P: parietal, IP: interparietal. Suturas - nf: nasofrontal, c: coronária, l: lambdóide, s: sagital. (Bernardi, 1987).

## REGISTRO DOS POTENCIAIS EVOCADOS CORTICAIS

Os registros dos potenciais evocados eram feitos na região parietal direita do córtex cerebral (figura 4A) através de um eletródio esférico de prata (1,5mm de diâmetro) colocado sobre a pia-mater e ligado em derivação unipolar, sendo o eletródio de referência preso à pele rebatida durante o procedimento cirúrgico.

Para a aplicação controlada dos estímulos tácteis à superfície dorsal da pata anterior esquerda do animal (figura 4B), uma pequena alavanca plástica era conectada a um estimulador eletrônico Eniac de onda quadrada. Pulsos retangulares de 4,0 volts e com duração de 1ms e frequência fixa de 1 Hz controlavam, então, através de um dispositivo eletromagnético, a movimentação uniforme da alavanca plástica para a estimulação da pata do animal.

Um micro-manipulador fixado ao aparelho estereotáxico permitia o deslocamento do eletródio de registro até uma posição em que os potenciais evocados podiam ser obtidos com bastante nitidez. O eletródio registrador estava conectado a um amplificador Grass e este, por sua vez, ligado a um osciloscópio Tektronix acoplado a um microcomputador que funcionava como um promediador fornecendo, diretamente, na tela do osciloscópio, os traçados finais que correspondiam às médias do número de

potenciais previamente determinado para o experimento. Rotineiramente, eram aplicadas séries de 32 estímulos tácteis à pata anterior do animal e a média dos 32 potenciais evocados resultantes era registrada na tela do osciloscópio.

O eletrocorticograma dos animais era monitorado através do próprio osciloscópio ou de um polígrafo Beckman de 8 canais. O tempo de duração dos registros variava de 10 a 90 minutos, dependendo do tipo de experimento a ser realizado.

#### REFERÊNCIAS ANATÔMICAS

Para que se possam determinar com precisão os locais de registro dos potenciais captados no córtex cerebral é necessário que se estabeleçam pontos de referência. Uma das características do cérebro do rato é ser sua superfície dorso-lateral praticamente lisa, sem giros ou circunvoluções que, em outras espécies, servem como referências; além disso, a localização de seus vasos é assimétrica e inconstante, não tornando possível a adoção, no próprio cérebro, de pontos de referência satisfatórios. Assim sendo, adotamos como referência as suturas do crânio do animal, que parecem ser os elementos que mais se prestam a isso (Negrão, 1967).

figura 4 - (A): área (L: de 3,5 a 6,2 e AP: de 1,5 a 5,8) onde era colocado o eletródio sobre a pia-mater. (B): local da superfície dorsal da pata anterior esquerda onde eram aplicados os estímulos tácteis. (C): posição da camara de superfusão (CS) e eletródio de registro (R).



Recobrando a superfície dorsal do cérebro ficam os ossos frontais, parietais e interparietal. O limite anterior do frontal é a sutura naso-frontal e o posterior é a sutura coronária. Esta é também o limite anterior do parietal; seu limite posterior é a sutura lambdóide. Esta separa os dois parietais do interparietal único. Os ossos frontal e parietal direitos e frontal e parietal esquerdos são separados entre si por uma sutura mediana, a sutura sagital (Negrão, 1967).

#### COORDENADAS UTILIZADAS PARA POSICIONAMENTO DO ELETRÓDIO REGISTRADOR

A posição do eletródio de registro para captação dos potenciais evocados corticais não era a mesma em todos os animais variando, na realidade, de 3,5 a 6,2 mm lateralmente à linha sagital e de 1,5 a 5,8 mm à frente da linha biauricular, uma vez que os pontos de registro eram selecionados individualmente, sendo escolhidos os locais onde os potenciais eram captados com maior nitidez e amplitude em cada animal.

A determinação dos locais de registro era feita projetando-se os pontos de referência sobre um mapa cartesiano das áreas corticais do rato, elaborado por Krieg (1946) e corrigido para efeito de paralaxe por Negrão (1967).

Figura 5 - A: Esquema mostrando o arranjo geral para os experimentos de micro-injeção no córtex cerebral. B: posição e dimensões do eletródio de registro e da agulha para as micro-injeções.

## GRUPOS EXPERIMENTAIS

Dois grupos experimentais diferentes foram desenvolvidos com o objetivo de se estudarem os possíveis efeitos da aplicação dos aminoácidos sob investigação no córtex cerebral de ratos. Os aminoácidos utilizados no presente projeto, glutamato e aspartato, eram rotineiramente dissolvidos em solução salina 0,9 g% tamponada, de maneira a se obter uma concentração final de  $2,5 \times 10^{-2}$  M com pH 7,0.

Todas as soluções, antes de serem usadas, eram mantidas em banho-maria, regulado para uma temperatura constante de 38°, e o córtex exposto era, também, mantido sob superfusão com solução salina a essa mesma temperatura até que o experimento fosse iniciado.

### GRUPO I - SUPERFUSÃO COM AMINOÁCIDOS

Neste grupo, uma pequena câmara de superfusão de polietileno de aproximadamente 4 mm de diâmetro era colocada na superfície exposta da pia-mater, concêntrica ao local de registro dos potenciais evocados corticais e vedada no local com vaselina, a qual também prevenia desidratação das regiões expostas. No interior dessa câmara eram aplicados topicamente os aminoácidos,

através de uma seringa de vidro. Antes, porém, da superfusão dos aminoácidos, o córtex cerebral era banhado continuamente com solução fisiológica tamponada e, durante esse período, eram registradas as médias de três séries consecutivas de 32 potenciais evocados cada uma. Essas três séries de potenciais evocados registrados imediatamente antes da aplicação dos aminoácidos foram considerados como controle para o estudo das possíveis alterações observadas nas amplitudes dos potenciais, conforme procedimento largamente utilizado nesse tipo de experimento.

O tempo de superfusão dos aminoácidos variava de 2 a 90 minutos dependendo do objetivo do experimento. Os experimentos de superfusão constaram de dois tipos: os de fase curta ( de 10 minutos de duração) e os de fase longa (de 90 minutos de duração). Nos de fase curta pode ser observada uma possível ação imediata dos aminoácidos, quando administrados ao córtex cerebral e, por isso, eram feitos registros dos potenciais evocados nos primeiros 10 minutos de superfusão, a intervalos de 2 minutos (2, 4, 6, 8 e 10 minutos após início da superfusão). Nesta série de experimentos foram utilizados 58 animais, sendo que 21 deles foram superfundidos com aspartato, 14 com glutamato, e 23 com solução fisiológica.

Para observarmos uma ação mais prolongada desses aminoácidos usamos 51 animais, que foram subdivididos em três

grupos: 20 animais para superfusão com aspartato, 12 com glutamato, 10 com solução salina. Nestes experimentos de superfusão prolongada foram efetuados registros de séries de 32 potenciais evocados a cada 10 minutos, durante um período de 90 minutos, em que o córtex cerebral exposto era continuamente banhado com solução salina, em uma das séries, ou com solução contendo as substâncias experimentadas, nas séries restantes.

Pelo fato de terem esses experimentos longa duração, julgou-se necessário eliminar a possibilidade de que uma possível remoção metabólica do anestésico pudesse interferir com a atividade elétrica cerebral. Por isso experimentos controle foram, também, realizados nos quais foram registrados o ECoG desses animais anestesiados com uretana durante 100 minutos, sendo que, no interior da câmara de superfusão era colocada solução salina tamponada para evitar um possível ressecamento da superfície cortical (figura 4).

## GRUPO II - MICRO-INJEÇÃO EM CAMADAS PROFUNDAS

Este grupo de animais foi submetido a micro-injeções de aminoácidos em camadas profundas do córtex cerebral, seguidas do registro de séries de potenciais evocados, conforme procedimento descrito para o grupo I. Assim sendo, após a exposição da

superfície cortical e localização da posição exata do eletródio de registro, uma cânula-guia de 0,5 mm de diâmetro externo sustentada por um suporte acoplado a um micromanipulador fixado ao aparelho estereotáxico, era posicionada a cerca de 0,7 mm à frente do eletródio de registro, em direção à extremidade anterior do animal. (Figura 5A). Essa cânula-guia era colocada de maneira a quase tocar a superfície cortical que, nestes experimentos, permanecia recoberta pela dura-mater. Um fino estilete era, em seguida, introduzido na cânula-guia de modo a ultrapassar a sua extremidade e perfurar a dura-mater. Por este ponto perfurado na dura-mater, exatamente na mesma direção da cânula-guia, era, no momento oportuno, introduzida a agulha através da qual seriam efetuadas as micro-injeções de aminoácidos. Todo o procedimento acima descrito era sempre efetuado com o auxílio de uma lupa manual afim de possibilitar a sua execução com o cuidado e a precisão necessários.

A cânula era sempre posicionada de maneira a formar um ângulo de  $42^{\circ}$  com a superfície cortical, e de modo a permitir o posicionamento da agulha para micro-injeção em um ponto próximo da linha perpendicular à superfície passando pelo eletródio de registro, a uma distância de aproximadamente 0,75 mm do mesmo (Figura 5B).

Esse grupo de 30 animais foi também subdividido em três subgrupos submetidos a micro-injeções de aspartato,

glutamato e solução fisiológica. As microinjeções foram todas de 1,0 ul, injetado à razão de 1,0 ul por minuto, através de uma micro-seringa SGE conectada à agulha de injeção por um fino tubo de polietileno. Nesses animais, após a introdução da agulha no córtex cerebral, eram registradas três séries de 32 potenciais evocados, que constituíam o controle para análise das alterações provocadas pelas substâncias injetadas. A seguir, eram injetadas as substâncias desejadas e registradas séries de 32 potenciais evocados a cada dois minutos a partir do início da microinjeção, durante os 10 minutos subseqüentes.

#### COMPROVAÇÃO HISTOLÓGICA

No final desses experimentos, era retirada a agulha de microinjeção e colocado, através da cânula-guia, um eletródio para lesão, isolado com exceção da extremidade, exatamente com o mesmo comprimento da agulha retirada, de maneira que a sua extremidade não isolada se localizasse precisamente no ponto em que havia sido feita a microinjeção. Era, então, aplicada, por esse eletródio uma corrente anódica, para lesão eletrolítica, de 2,0 mA durante 5,0 segundos. A pequena lesão, assim produzida era, posteriormente, utilizada para a localização da exata posição da extremidade da agulha por ocasião da microinjeção.

Depois disso, o cérebro do animal era retirado e colocado em uma solução de formol a 10% por, pelo menos, 7 dias para fixação do material. Após este período a peça era incluída em parafina e a porção onde fora feita a microinjeção era cortada em fatias de 5,0 um de espessura. Finalmente era efetuada a coloração, pelo método de Nissl (Cresil violeta) e, por exame ao microscópio óptico, eram identificados os locais das microinjeções.

#### ANÁLISE DOS DADOS: PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

A resposta evocada cortical induzida por estimulação táctil apresenta uma onda inicial positiva seguida de outra negativa. No presente trabalho foram analisadas as alterações observadas nas amplitudes dessas ondas em consequência dos procedimentos experimentais anteriormente descritos. Essas amplitudes foram medidas da linha base até o pico da onda positiva inicial e do pico da deflexão negativa até a sua base, marcada pelo início da onda subsequente (figura 6), conforme procedimento usualmente empregado no estudo desses potenciais (Schlag, 1974).

No grupo I onde foi feita a superfusão com aminoácidos durante 10 minutos era feita a promediação de 32 potenciais evocados a cada 2 minutos e era calculada a amplitude média das



ondas obtidas durante aquele intervalo de tempo. Era, com base nesses resultados, calculada, então, a porcentagem das variações observadas em relação ao controle obtido antes de iniciada a superfusão.

Ainda no grupo I, na fase longa de superfusão, os registros das promediações de 32 potenciais evocados foram feitos de 10 em 10 minutos até os 90 minutos após o início da superfusão. As médias desses registros, em cada intervalo de tempo, eram então comparadas aos valores controle e, as variações expressas em porcentagens.

No segundo grupo, onde foram efetuadas microinjeções de aminoácidos em camadas corticais profundas, foram registradas as promediações de 32 potenciais evocados dos 2 aos 10 minutos, com intervalos de 2 minutos após o término da micro-injeção. A partir desses registros era então calculada a amplitude média dessas ondas que era, depois, comparada com a amplitude média das ondas antes da administração dos aminoácidos, e analisadas as porcentagens das alterações observadas.

Uma vez que havia variabilidade na amplitude dos potenciais, de animal para animal, quando medidas em milivolts, devido às condições de cada um dos animais e do ponto de melhor registro dos potenciais, as alterações observadas eram sempre analisadas quanto à porcentagem de variação em relação aos valores controle obtidos antes da aplicação dos aminoácidos.

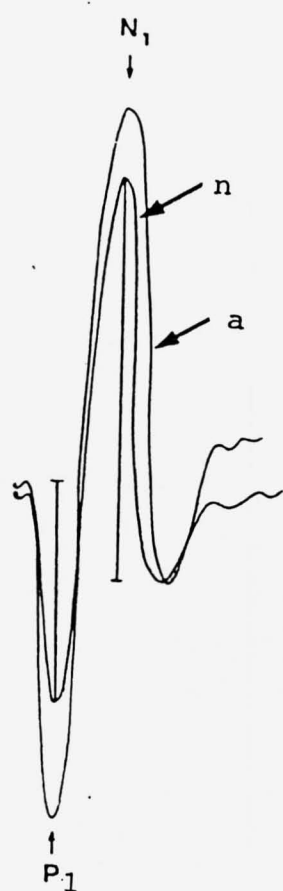


Figura 6 - Esquema de um potencial evocado. Amplitude dos componentes P1 e N1 aumentada pela aplicação de aminoácidos. (n): amplitude normal. (a): amplitude aumentada. Calibração: 50mV, 50ms.

Assim sendo, foram utilizados testes não paramétricos de Wilcoxon na análise dos resultados obtidos. Todos os métodos estatísticos empregados estão de acordo com Meddis (1975).

## RESULTADOS

Os experimentos por nós realizados mostraram que a superfusão com solução salina 0,9%, por tempo prolongado, não altera o registro eletrocorticográfico do hemisfério superfundido (figura 7) e, possivelmente, também não interfira de maneira significativa nas condições fisiológicas do tecido subjacente, conforme demonstraram os registros dos potenciais evocados efetuados em períodos de até 90 minutos de experimentação.

Nossos experimentos demonstraram também, claramente, que a superfusão, com aspartato ou glutamato, da face exposta da pia-mater que recobre o córtex cerebral provoca alterações estatisticamente significativas na amplitude das ondas P1 e N1 dos potenciais evocados induzidos por estimulação tátil da pele da pata anterior contralateral. Alterações nessas respostas foram, ainda, observadas quando, ao invés da superfusão, era feita a micro-injeção daqueles aminoácidos a 0,75mm da superfície cortical. As alterações mencionadas serão expostas a seguir.

Os experimentos de superfusão foram subdivididos em duas fases, a de curta e a de longa duração.

### GRUPO I - FASE CURTA

Neste grupo foram utilizados 58 animais, sendo que 21

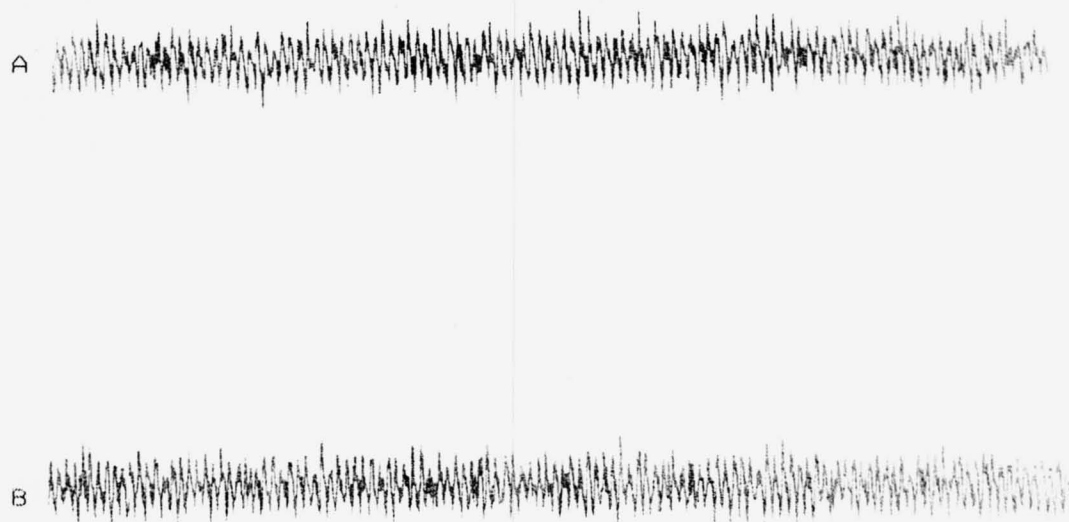


Figura 7- Registro eletrocorticográfico ao longo de 90 minutos em animais anestesiados com uretana 25% cujo córtex cerebral era banhado com solução salina 0,9%. Em A temos o registro no início, logo após a instalação da camara de superfusão e, em B após 90 minutos de superfusão com solução salina 0,9%.

deles foram superfundidos com aspartato, 14 com glutamato e 23 com solução fisiológica.

Nas figuras 8 a 10 estão apresentadas as variações das amplitudes dos potenciais evocados somato-sensoriais durante 10 minutos de superfusão cortical com aspartato, glutamato e também com solução salina 0,9%.

Os resultados da fase de superfusão de curta duração com aspartato podem ser vistos na figura 8. Esta mostra que, com exceção do tempo de 2 minutos, em que as amplitudes das ondas P1 eram significativamente menores ( $P < 0,01$ ), não foram observadas alterações apreciáveis nessa onda nos demais tempos ( $P > 0,05$ ). Em relação ao componente N1 não foram detectadas alterações significativas em nenhum dos tempos de registro ( $P > 0,05$ ).

Quando a superfusão cortical era realizada com glutamato após o controle da superfusão com a solução salina 0,9%, as amplitudes dos potenciais evocados promediados corticais das ondas P1 eram significativamente mais altas para os tempos de 4 a 8 minutos ( $p < 0,01$ ) e também no intervalo de 10 minutos ( $p < 0,05$ ). Para o componente N1, o aumento foi significativo aos 4 ( $p < 0,05$ ) e aos 6 e 8 minutos ( $p < 0,01$ ) (figura 9).

Não houve significância na variação nas amplitudes dos potenciais evocados corticais quando a superfusão foi realizada apenas com a solução salina ( $p > 0,05$ , Teste de Wilcoxon) (figura 10).

# SUPERFUSÃO FASE CURTA ASPARTATO

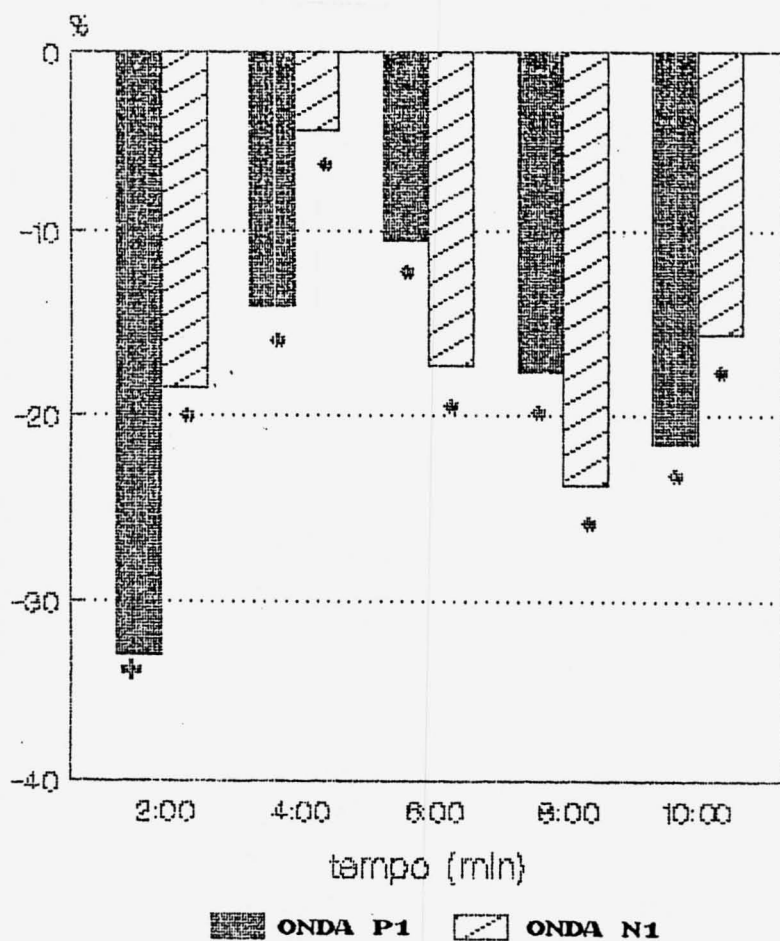


Figura 8 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1 expressas em percentagem, durante a superfusão com aspartato (25mM) por um período de 10 minutos. O ponto zero na ordenada representa a amplitude das respostas obtidas antes da superfusão com o aminoácido. (+): significativo ( $p < 0,01$ ), (\*): não significativo.

# SUPERFUSÃO FASE CURTA GLUTAMATO

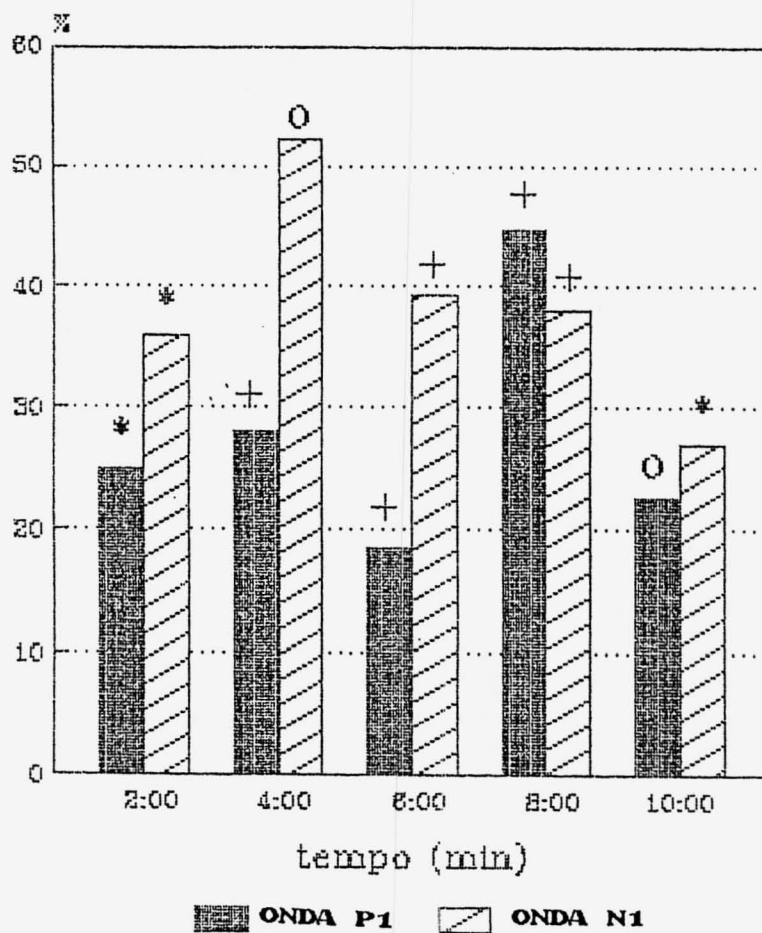


Figura 9 - Medianas dos aumentos das amplitudes das ondas P1 e N1 expressas em percentagem, durante a superfusão com glutamato (25mM) por um período de 10 minutos. O ponto zero na ordenada representa a amplitude das respostas obtidas antes da superfusão com o aminoácido. (+): significativo ( $p < 0,01$ ), (o): significativo ( $p < 0,05$ ), (\*): não significativo.



SUPERFUSÃO FASE CURTA SALINA 0,9%.

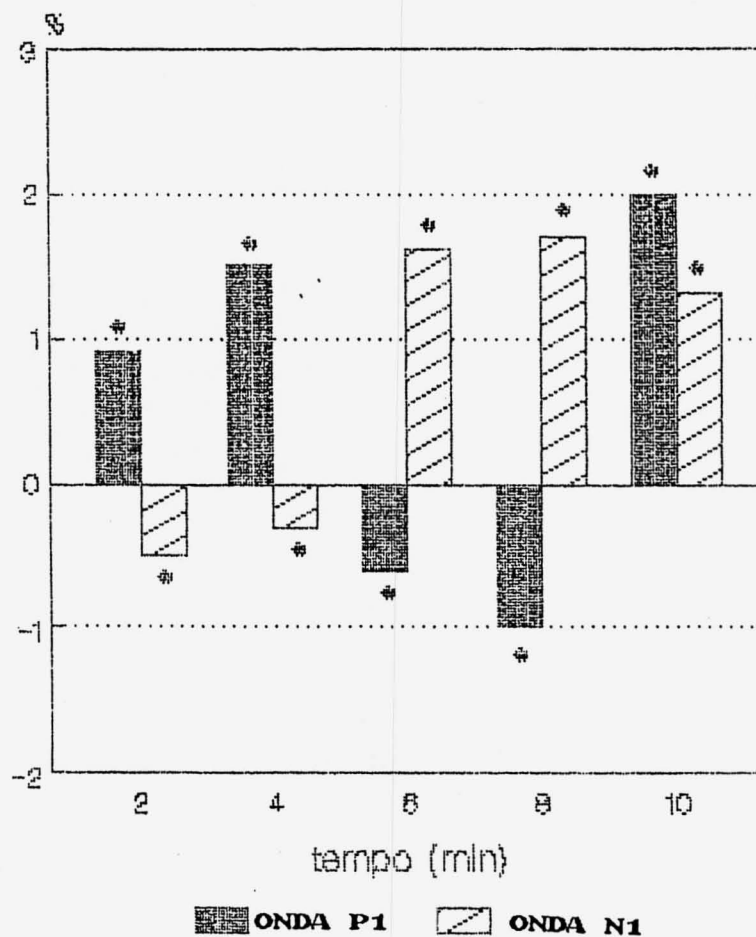


Figura 10 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1 em percentagem, durante a superfusão com solução salina 0,9%, por um período de 10 minutos. (\*): não significativo.

## GRUPO I - FASE LONGA

Para esta fase foram utilizados 42 animais, assim distribuídos: 20 animais foram superfundidos com aspartato, 12 com glutamato e 10 com solução salina 0.9%.

Nas figuras 11 a 13 podem ser vistas as variações das amplitudes das ondas P1 e N1 dos experimentos realizados com superfusão de longa duração (90 minutos), quando comparadas com os valores controle, quando o córtex cerebral dos animais era superfundido com aspartato, glutamato e solução salina 0,9%.

Durante a superfusão cortical com aspartato a onda P1 apresentou diminuição significativa em todos os intervalos de tempo, exceto para o intervalo de 10 minutos ( $p < 0,01$  nos demais intervalos de tempo, Teste de Wilcoxon). No componente N1 os tempos são significativos ( $p < 0,01$  para os intervalos de 40, 60, 70 e 80 e  $p < 0,05$  para o intervalo de 90 e 50 minutos, Teste de Wilcoxon), não havendo significância, porém apenas uma aparente tendência, nos intervalos de 20 e 30 minutos (figura 11).

Tendo sido o córtex superfundido com glutamato, os componentes P1 dos potenciais evocados corticais eram significativamente maiores que o controle nos intervalos de tempo de 10 a 70 minutos ( $p < 0,01$ , Teste de Wilcoxon), apresentando os intervalos de 80 e 90 minutos apenas uma aparente tendência de aumento, sem significância. Os componentes N1 tinham as suas

amplitudes aumentadas significativamente em vários intervalos ( $p < 0,01$  para os intervalos de 10 e 50 a 90 minutos e  $p < 0,05$  para o intervalo de tempo de 40 minutos, Teste de Wilcoxon) e revelavam apenas uma aparente tendência de aumento para os intervalos de tempo de 20 e 30 minutos (figura 12).

A superfusão cortical com solução salina nesta fase não teve diferença significativa da superfusão controle ( $p > 0,05$ , Teste de Wilcoxon), em todos os intervalos de tempo (figura 13).

# SUPERFUSÃO FASE LONGA ASPARTATO

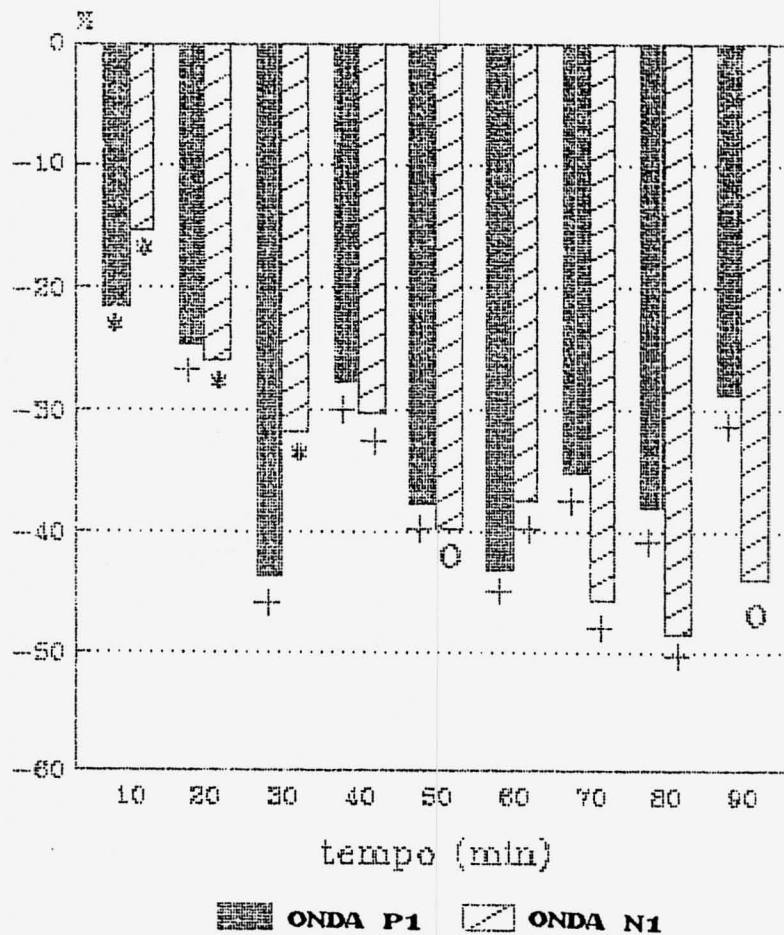


Figura 11 - Medianas dos aumentos das amplitudes das ondas P1 e N1, durante a superfusão cortical com aspartato por 90 minutos. Explicações na figura 9.

# SUPERFUSÃO FASE LONGA GLUTAMATO

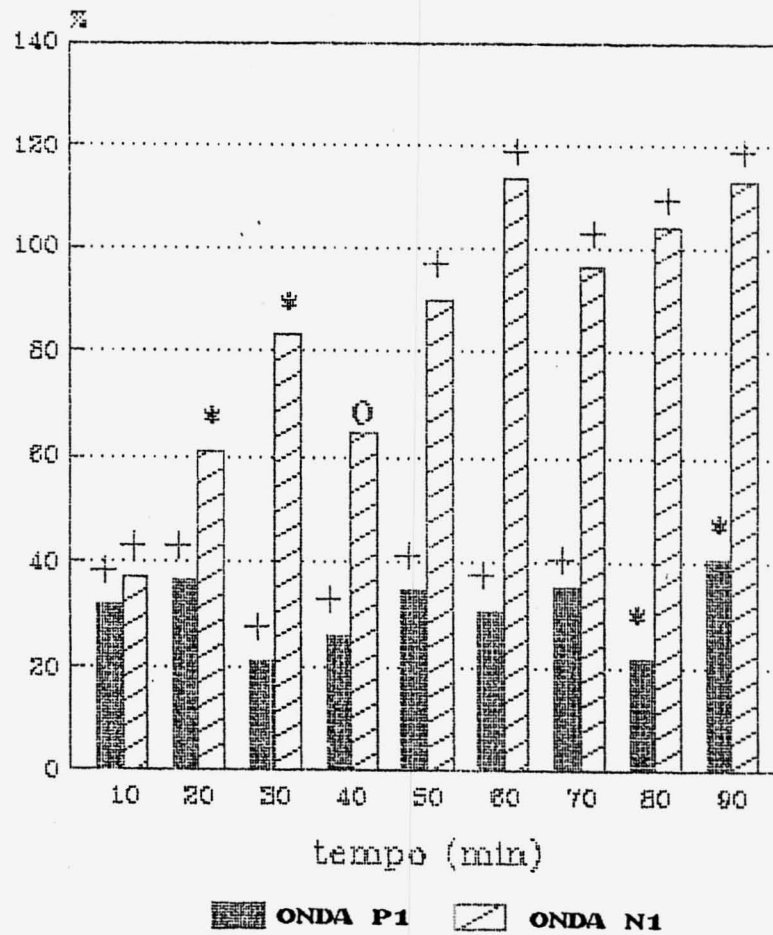


Figura 12 - Medianas dos aumentos das amplitudes das ondas P1 e N1, durante a superfusão cortical com glutamato por 90 minutos. Explicações na figura 9.

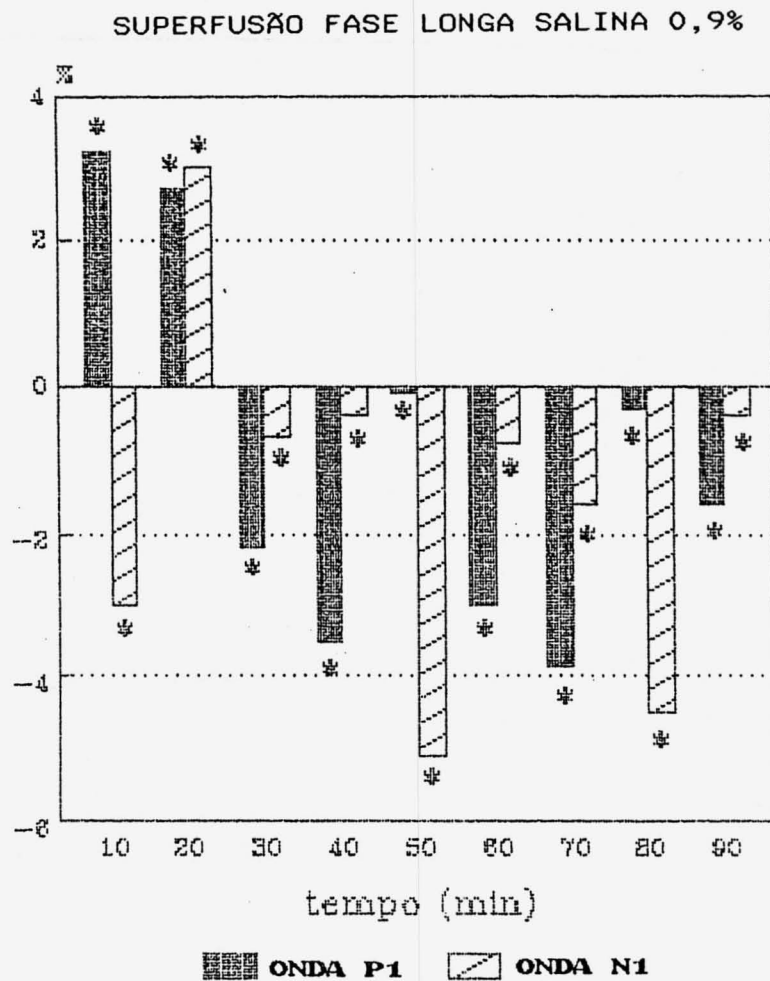


Figura 13 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1, durante a superfusão cortical com solução salina 0,9% por 90 minutos. Explicações na figura 9.

## GRUPO II - MICROINJEÇÃO

Neste grupo foram utilizados 30 animais, dos quais 13 receberam microinjeção de aspartato, 7 de glutamato e 10 de solução salina 0,9%.

As figuras 14 a 16 apresentam as variações das amplitudes, em percentagens, dos potenciais evocados somato-sensoriais até 10 minutos após a microinjeção de aspartato, glutamato e solução salina 0,9%, quando comparados com os valores controle.

As medianas das variações das amplitudes das ondas P1 tiveram um aumento significativo em todos os intervalos de tempo após a microinjeção de aspartato ( $p < 0,05$  para os intervalos de 2, 4 e 8 e 10 minutos e  $p < 0,01$  para o intervalo de 6 minutos, Teste de Wilcoxon). Com relação ao componente N1, apenas o intervalo de tempo de 10 minutos apresentou significância estatística ( $p < 0,1$ ), embora todos os outros intervalos de tempo tenham apresentado uma aparente tendência de aumento (figura 14).

Quando feita a microinjeção com glutamato, as variações das amplitudes foram significativamente aumentadas em relação ao controle ( $p < 0,01$ , Teste de Wilcoxon), tanto para o componente P1 quanto para o N1 (figura 15).

A microinjeção de salina mostrou que as medianas das amplitudes das variações quando comparadas aos valores controle

não tinham diferença significativa em nenhum intervalo de tempo em ambos os componentes dos potenciais evocados corticais (figura 16).



# MICRO-INJEÇÃO ASPARTATO

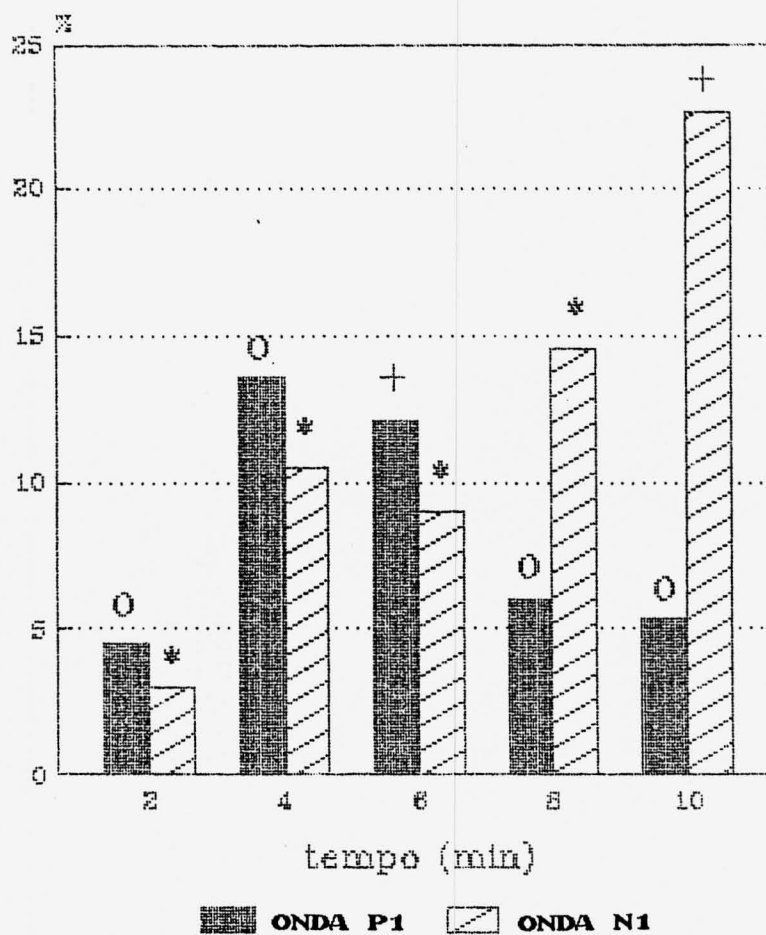


Figura 14 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1 durante a micro-injeção de aspartato (25mM). Explicações na figura 9.

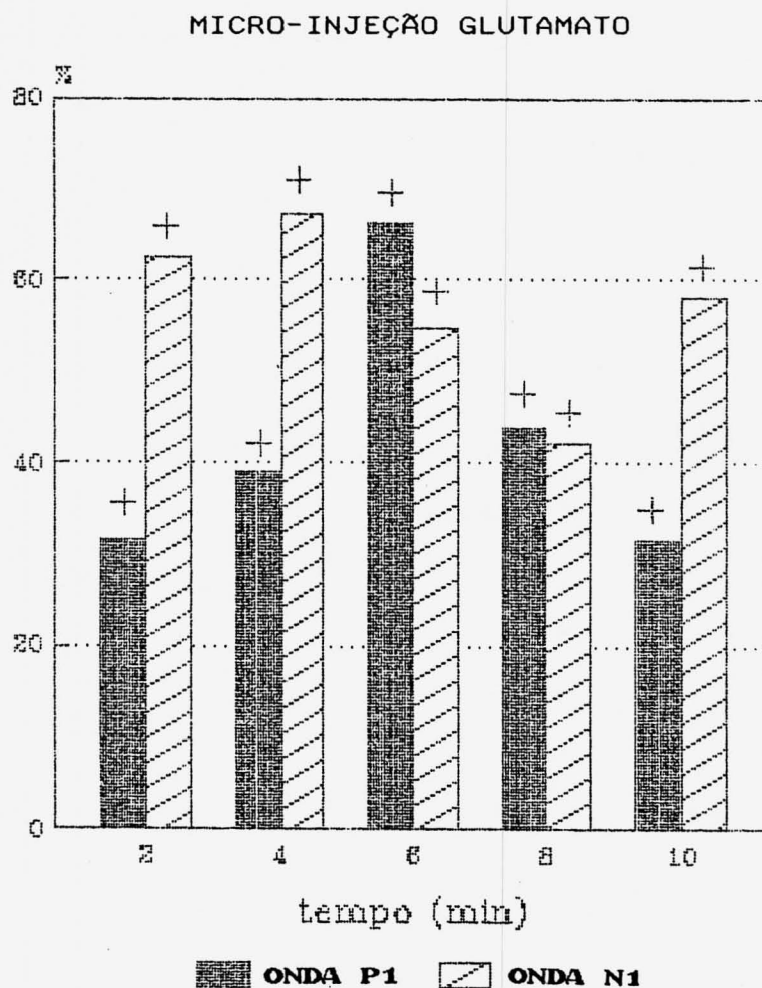


Figura 15 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1 durante a micro-injeção de glutamato (25mM). Explicações na figura 9.

# MICRO-INJEÇÃO SALINA 0,9%

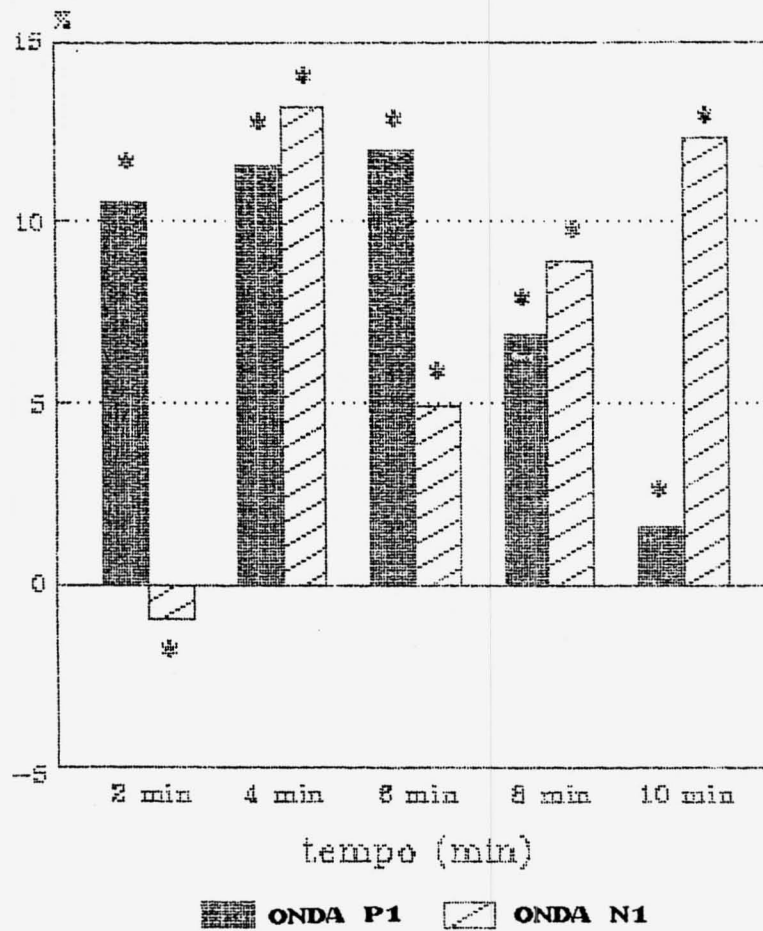


Figura 16 - Medianas das variações das amplitudes das ondas P1 e N1 durante a micro-injeção de solução salina 0,9%. Explicações na figura 9.

## DISCUSSÃO

Estudos envolvendo preparações "in vivo" requerem, obviamente, a manutenção das estruturas sob investigação do modo mais similar possível às condições fisiológicas encontradas com uma animal intacto. No SNC dos mamíferos há diversas estruturas superficiais, incluindo o córtex cerebral, nas quais registros da atividade elétrica espontânea e de potenciais evocados podem ser feitos com um mínimo de interferência no tecido nervoso.

A estimulação química apresenta sobre a elétrica a óbvia vantagem de promover uma alteração em corpos celulares e árvores dendríticas situados na região da superfusão ou da microinjeção sem, ao mesmo tempo, ativar ou inibir fibras de passagem. A estimulação elétrica, assim como a lesão eletrolítica localizada, é menos definida em virtude de interagir, também, com as fibras que cruzam a região estimulada. Embora haja evidências de que existam sinapses localizadas ao longo dos axônios, os chamados botões de passagem (Bradford, 1986), sua ocorrência parece ser sempre ligada à árvore dendrítica objeto de sua ação final, provavelmente para aumento dos efeitos produzidos pelas fibras de chegada, e não ao longo das vias. Assim sendo, a estimulação química muito provavelmente deva apresentar uma maior especificidade do que a elétrica, em virtude da não interferência

sobre fibras de passagem.

Quando são aplicadas soluções de quaisquer substâncias ao SNC é de fundamental importância que seja assegurada a não interferência pelo veículo através do qual as substâncias são administradas, tanto no que se refere à sua natureza como ao seu pH, concentração ou volume. Portanto, um cuidadoso trabalho no sentido de que os fatores acima mencionados não viessem a se constituir em possível fonte de alteração dos resultados por nós obtidos foi efetuado antes do início dos experimentos.

Existe, também, a possibilidade de que os aminoácidos administrados exerçam algum tipo de ação em terminais sinápticos da região onde foi feita a microinjeção, além de ali agirem sobre corpos celulares e dendritos que possuam receptores específicos para eles.

Assim como na presente investigação, a solução salina a 0,9% tem sido largamente utilizada como controle ou veículo em experimentos de microinjeção, microiontoforese ou aplicação tópica de aminoácidos (Assumpção *et al.*, 1979; Carobrez *et al.*, 1985; De Montigny & Lund, 1980; Kaczmarek & Adey, 1975; Rossi & Bernardi, 1983, 1985).

Microinjeções de volumes iguais àqueles empregados neste trabalho, também têm sido efetuadas em inúmeras pesquisas do mesmo gênero e, em experimentos equivalentes, soluções cujo pH varia entre 4,0 e 8,0 têm sido normalmente utilizadas (Bandler *et*

al., 1985; Bernardi, 1982; De Montigny & Lund, 1980; Kitsikis & Steriade, 1981; Smialowski, 1978).

Uma vez que nenhuma alteração perceptível foi observada após a superfusão e microinjeção de solução salina, esta solução pode ser considerada como controle em relação ao pH e ao volume das soluções administradas. Assim sendo, pode se considerar como muito pouco provável que os efeitos observados após a aplicação dos aminoácidos utilizados tenham sido consequência quer do volume injetado, quer do pH ou, ainda da concentração dos mesmos. Além disso, os fatores acima mencionados provavelmente não poderiam ter um papel relevante nos resultados obtidos, uma vez que, dependendo dos aminoácidos administrados, os efeitos observados eram diferentes (Rossi & Bernardi, 1983, 1985).

Em experimentos que envolvem microinjeção de substâncias no SNC é fundamental a escolha do volume e da concentração das mesmas, pois é imprescindível que, ao mesmo tempo em que esses parâmetros sejam suficientes para induzir respostas nítidas e constantes, não provoquem eles alterações locais tão intensas que venham a comprometer ou mesmo dificultar a interpretação dos resultados. É importante que tanto o volume como a concentração sejam os menores possíveis mas, também, que sejam suficientes para atingir uma população neuronal de dimensões tais que qualquer alteração no seu funcionamento possa

ser detetada claramente no parâmetro que esteja sendo analisado.

A concentração dos aminoácidos utilizada no presente trabalho está, na verdade, muito abaixo daquelas empregadas em experimentos semelhantes (Bandler *et al.*, 1985; Smialowski, 1978) e é, também, bastante inferior, inclusive, a concentrações utilizadas em aplicações com microiontoforese (Assumpção *et al.*, 1979; Choi & Fischbach, 1981). Soluções de 25mM têm sido utilizadas com sucesso em experimentos envolvendo aplicação tópica de aminoácidos (Kaczmarek & Adey, 1975; Rossi & Bernardi, 1983, 1985), porém, quando são feitas microinjeções geralmente são necessárias soluções de 50mM ou mais. A concentração de aminoácidos neurotransmissores nos terminais nervosos é bastante alta; bem mais elevada do que sua concentração média no SNC. Por exemplo, a concentração média de GABA no tecido nervoso é de cerca de 2mM, enquanto que sua concentração nos terminais sinápticos varia entre 50 e 150mM (White, 1981). O glutamato, que é o aminoácido central mais abundante, apresenta uma concentração média de 10 - 50mM, e estima-se que nos terminais nervosos ela seja ainda mais elevada (Fonnum & Malthé-Sorensen, 1981). Assim sendo, concentrações relativamente altas parecem ser necessárias para atingir uma população celular suficiente para produzir alterações comportamentais detetáveis, dependendo do parâmetro analisado.

Todavia, também no mesencéfalo, concentrações iguais ou

muito próximas (50 - 60mM) daquela empregada neste estudo, aplicadas no mesmo volume ao aqui utilizado, têm, igualmente, sido suficientes para produzir resultados bastante claros e constantes (Behbehani & Fields, 1979; Urca *et al.*, 1980). É interessante notar que, conforme colocaram Vivaldi e colaboradores (1980) acerca do sono quimicamente induzido, "a atividade de uma área bastante restrita pode orquestrar todo o cérebro, de maneira a modificar o estado comportamental do animal". Talvez por isso não sejam necessárias doses muito elevadas para produzir alterações nos potenciais elétricos corticais.

Na realidade o fato de serem necessárias concentrações bastante diferentes para que micro-injeções de aminoácidos possam produzir resultados detectáveis na análise de parâmetros diversos não é de fácil explicação.

A hipótese de que baixas concentrações agiriam apenas sobre corpos celulares e dendritos, enquanto que altas concentrações afetariam, também, fibras de passagem, foi descartada por Bandler e colaboradores (1985) que realizaram, sem obter nenhuma alteração, micro-injeções de aminoácidos excitatórios em altas concentrações (até 2,0 M) em feixes de fibras, nos mesmos locais onde eram obtidos resultados positivos por estimulação elétrica.

Talvez a explicação mais plausível para as diferenças



observadas seja a de que exista diversidade regional tanto na densidade neuronal quanto na de receptores específicos.

Tem sido demonstrado que a câmara plástica de superfusão em contacto com a membrana pial não afeta as estruturas celulares do tecido nervoso e, além disso, foi observado não existir nenhuma diferença significativa entre o eletrocorticograma do lado da superfusão e aquele registrado na superfície contralateral (Wright *et al.*, 1971).

Estudos sobre o nível de desaparecimento de diferentes substâncias da câmara de superfusão em contacto com a superfície pial do córtex cerebral têm demonstrado que quantidades relativamente pequenas de aminoácidos marcados abandonam a câmara durante o período de uma hora em que aquelas daquelas substâncias banharam o tecido cerebral (Nogueira *et al.*, 1965). Após esse tempo, enquanto somente 45% do álcool etílico permaneciam na câmara, havia ainda cerca de 90% de leucina e de 91 a 92% de GABA e glutamato dentro da mesma.

A transferência de cada substância depende, presumivelmente, de seu movimento através da pia. Tem sido sugerido que a membrana pial e sua vascularização têm um importante papel na transferência de substâncias para dentro e para fora do espaço subaracnóide (Wright *et al.*, 1971). Esses autores observaram que a remoção da pia mater resultava em um decréscimo significativo no desaparecimento do GABA, glicina e

uréia marcados da câmara de superfusão. Assim, após um período de superfusão de cinco horas, com a pia mater intacta, cerca de 58 a 60% do GABA inicial permaneciam na câmara de superfusão, enquanto que, removendo-se a pia, cerca de 74 a 84% desse aminoácido ainda continuavam dentro da câmara após o mesmo período. É estimado que de 40 a 42% do total de aminoácido que deixa a câmara durante a superfusão, 16 a 26% não alcançam os vasos da pia. Cerca de 1/3 a 2/3 dos aminoácidos deixam o espaço subaracnóideo indo, presumivelmente, para o tecido cerebral. Após atravessar a pia mater, a difusão dos aminoácidos através do tecido nervoso está sujeita à influência de diversos fatores como taxa de catabolismo e de captação por diferentes grupos celulares, bem como sua velocidade de difusão.

Foi observado que após uma superfusão durante cinco horas do córtex cerebral de gatos com aminoácidos marcados com carbono-14, incluindo o GABA e o glutamato, cerca de 87 a 95% da radioatividade estavam presente em camadas até 3mm da superfície (Nogueira *et al.*, 1965). Além disso, investigações em córtex cerebelar de ratos têm demonstrado que a superfusão de aminoácidos durante 55 minutos era suficiente para permitir a difusão dessas substâncias através das três camadas do córtex cerebelar desses animais (Bernardi, 1979).

Existem evidências de que os possíveis aminoácidos neurotransmissores marcados sejam tomados pelo tecido nervoso e

têm acesso ao reservatório interno de aminoácidos e, além disso, foi encontrada uma distribuição similar entre as substâncias marcadas e as endógenas (Iversen & Neal, 1968).

Vê-se, portanto, que a superfusão do córtex cerebral com diferentes substâncias constitui-se num método perfeitamente adequado para que toda a região constituída pelas camadas celulares corticais seja exposta à ação das mesmas. Na realidade, esse método tem sido amplamente utilizado em estudos que envolvem o emprego e a investigação de substâncias neurotransmissoras ou de drogas com elas relacionadas.

Informações aferentes do corpo atingem o córtex cerebral através de dois principais sistemas ascendentes: o da coluna dorsal e o espino-talâmico. As grandes fibras aferentes mielinizadas que vêm dos receptores na pele, tecido subcutâneo e tecidos profundos entram na raiz dorsal. Ali cada axônio se divide e envia uma longa ramificação para dentro da coluna dorsal para sinapses na medula com células dos núcleos da coluna dorsal. Axônios de segunda ordem de células sensoriais dos núcleos da coluna dorsal cruzam a linha média ainda na medula oblonga. Estes axônios, então, ascendem ao tronco cerebral e formam sinapses com células no nucleo ventral posterior lateral do tálamo. Os neurônios de terceira ordem no tálamo mandam axônios ao córtex cerebral, à área sensorial primária (S-I) e também secundária (S-II).

O núcleo ventral posterior lateral e o grupo nuclear posterior mediam a projeção ao córtex somatossensorial, que inclui as áreas S-I, S-II e as de associação somatossensorial.

Ao chegarem ao córtex cerebral os impulsos vindos da periferia provocam ali alterações que podem ser registradas, em sua superfície ou profundidade, sob forma de potenciais evocados.

Esses potenciais, que resultam de fluxos extracelulares de corrente gerados pelas respostas pós-sinápticas locais dos neurônios, são devidos a uma mudança no padrão de atividade elétrica dos neurônios, como resultado da estimulação dos órgãos sensoriais ou de alguma parte das vias sensoriais que vêm da periferia.

Respostas primárias evocadas no córtex cerebral e rigorosamente relacionadas ao estímulo são específicas do sistema sensorial que as evocam.

O potencial evocado registrado não é realmente aparente no EEG de fundo, e programas de médias computadorizadas são necessários para registrar esses potenciais. O potencial evocado primário registrado sobre o córtex somatossensorial em resposta a um estímulo elétrico ou tátil tem uma certa latência seguindo-se, depois, um potencial positivo; esta primeira fase positiva é o resultado da excitação, em camadas corticais profundas, vinda do núcleo ventral posterior do tálamo. Resulta de fluxos extracelulares de corrente gerados pelas respostas pós-sinápticas

locais dos neurônios. A forma da onda positiva-negativa registrada na superfície resulta de uma ou da combinação das seguintes condições: (1) despolarização dos corpos celulares das camadas mais profundas do córtex, ao que se segue ou se sobrepõe a despolarização de membranas adjacentes ao eletrodo, ou seja, os dendritos apicais; (2) polarização dos dendritos, seguida de despolarização; (3) despolarização de corpos celulares localizados mais profundamente, seguida de polarização, etc. A resposta tardia negativa, com uma relativamente longa latência é o resultado da entrada de sinais nas camadas corticais superficiais. Este potencial difásico pode, algumas vezes, ser observado sobrepondo-se a uma onda positiva de longa duração. Esta onda, provavelmente, reflete a inibição de longa duração neste nível do soma.

É sabido, também, que a resposta evocada cerebral para a estimulação periférica, no rato anestesiado, pode ser considerada como a soma das respostas elétricas de uma variada população de elementos corticais (Angel *et al.*, 1980).

Angel (1977) observou alterações nas amplitudes dos componentes positivo e negativo dos potenciais evocados com a variação da temperatura corpórea do homem. Esse resultado nos levou a monitorar durante todo o tempo de execução do experimento a temperatura corpórea dos animais (mantidos a  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) e, também a temperatura das soluções de superfusão.

Tanto o aspartato como o glutamato, quando introduzidos diretamente na parte arterial da região préóptica do hipotálamo produzem uma hipertermia dose-dependente (Yakimova & Ovtcharov, 1989). Isso, provavelmente, esteja relacionado a uma possível mediação desses aminoácidos na região. Todavia, nos animais de experimentação do presente projeto nenhuma alteração térmica foi observada durante todo o período de aplicação daquelas substâncias.

Como os experimentos, no presente projeto, abrangiam em algumas situações, um período relativamente prolongado, optou-se pelo uso de uretana como anestésico, por não haver necessidade da suplementação de sua dose durante todo o tempo de trabalho e, também, pelo fato de manter esse anestésico uma atividade sincronizada e sem alterações significativas durante todo o tempo do experimento.

Os resultados dos experimentos relatados neste projeto confirmam uma possível participação dos aminoácidos excitatórios aspartato e glutamato nos circuitos sinápticos do córtex cerebral do rato, tendo em vista as alterações ocorridas nos potenciais evocados somatossensoriais após superfusão ou micro-injeção dessas substâncias na referida estrutura.

Esses aminoácidos parecem ser os transmissores que mediam a ação sináptica excitatória produzida por uma certa população de interneurônios no córtex cerebral de mamíferos.

Estudos anteriores (Brodal, 1981; Carpenter, 1976) evidenciam que grandes quantidades de células estreladas nas camadas III e IV cujos axônios fazem sinapses com dendritos apicais das células piramidais e também, embora um pouco mais raramente, com corpos celulares dessas células. Outro fato de interesse é que fibras aferentes tálamo-corticais provenientes do complexo ventro-basal terminam principalmente a nível de camadas III e IV fazendo sinapse com interneurônios corticais ou com dendritos das células piramidais.

As camadas III e IV nos animais cujos pesos encontram-se dentro da faixa utilizada no presente projeto seguramente localizam-se cerca de 0,7 a 0,8mm abaixo da superfície cerebral. Assim sendo, os aminoácidos foram sempre cuidadosamente injetados na proximidade dessas camadas e os potenciais evocados foram registrados até dez minutos após essa micro-injeção. Portanto, de acordo com esse planejamento experimental, tornava-se possível a obtenção de registros adequados da atividade de grupos celulares sob a ação das substâncias por nós utilizadas.

No presente trabalho não houve a preocupação de se analisarem pormenorizada e particularmente os resultados de cada intervalo de tempo em que foram obtidos os potenciais evocados, em virtude da inconsistência de um procedimento desse tipo em um planejamento experimental como o empregado neste projeto. Obviamente, os locais de estimulação e de registro não eram os

mesmos em todos os animais, uma vez que sempre existe ampla variação individual na representação cortical somática (Souza, 1980). Certamente, o posicionamento da agulha de micro-injeção em relação ao eletródio de registro não foi sempre o mesmo. A posição da agulha em relação às camadas corticais, também, deve ter apresentado variações, uma vez que há variação natural na própria distribuição celular cortical de um animal para outro. Assim sendo, julgamos ser correta apenas a análise dos efeitos globais provocados pela administração dos aminoácidos nas diferentes condições experimentais programadas, conforme o procedimento adotado neste trabalho.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram claramente que os ácidos aspártico e glutâmico interferem nos mecanismos da transmissão sináptica a nível do córtex cerebral do rato. Todavia, embora sejam abundantes as evidências de que ambos apresentam características de neurotransmissores excitatórios no SNC, nossos resultados mostram, também, que eles não atuam nos mesmos tipos de sinapses corticais, conforme evidenciam alterações opostas provocadas por eles em circunstâncias idênticas, como é o caso da superfusão de longa duração.

A não alteração significativa dos potenciais evocados durante a fase curta de superfusão com aspartato indica que o mesmo não chega aos locais de sua atuação nos primeiros minutos, sendo necessário um tempo maior para que ele atinja, nesses



locais, concentrações suficientes para produzir efeitos detectáveis. O mesmo não acontece com o glutamato, cuja ação faz-se sentir logo aos quatro minutos após o início da superfusão.

O fato de que as primeiras sinapses em que esses aminoácidos poderiam atuar provavelmente encontram-se aproximadamente à mesma distância da superfície do córtex sugere que o glutamato possivelmente tenha condições de atingir com mais rapidez regiões corticais mais profundas. Como visto anteriormente, isto poderia ser conseqüência de diferentes velocidades de difusão, diferentes taxas de catabolismo ou, ainda, da captação por grupos celulares diversos e a velocidades diferentes.

Uma vez que o catabolismo do aspartato não é mais rápido do que o do glutamato e, ainda que este possuía peso molecular ligeiramente maior do que o daquele (Davidson, 1976), o obstáculo maior para que concentrações suficientes de aspartato não sejam atingidas nos locais de sua atuação provavelmente esteja relacionado à sua maior taxa de captação por neurônios e células da glia, provavelmente astrócitos. Outra possibilidade é a de que sejam necessárias maiores concentrações de aspartato do que de glutamato para que produzam resultados detectáveis ao registrarem-se os potenciais evocados na superfície cortical.

No caso da superfusão por períodos mais prolongados a

saturação progressiva do tecido cerebral com o aminoácido faz com que o mesmo atinja concentrações maiores em locais mais profundos. Todavia, mesmo após a superfusão por 90 minutos com aspartato este provavelmente não atinge níveis apreciáveis na região da chegada dos aferentes talâmicos específicos, uma vez que as micro-injeções nessas áreas produzem efeitos opostos ao da superfusão, o que não acontece com o glutamato.

O fato de serem as amplitudes dos componentes P1 e N1 dos potenciais evocados significativamente diminuídas pela superfusão e aumentadas pela micro-injeção sugere fortemente uma ação facilitadora do aspartato a nível da chegada das fibras talâmicas aferentes excitatórias, a par de um efeito fisiologicamente inibitório sobre as terminações mais superficiais. Este efeito provavelmente se faria sentir através de uma ação facilitadora sobre células estreladas inibitórias. O aspartato teria, portanto, uma ação excitatória em duas regiões diferentes, uma a nível das membranas que recebem os impulsos talâmicos e outra a nível dos interneurônios inibitórios das camadas mais superficiais. Assim sendo, a superfusão com esse aminoácido facilitaria a inibição nessas camadas e a micro-injeção facilitaria a recepção dos aferentes sensoriais extra-corticais.

Quanto aos efeitos provocados pelo glutamato, vê-se que são eles bastante intensos e instalam-se rapidamente, logo após

a sua administração. Isso indica que esse aminoácido atinge, nos locais de sua atuação e em tempo bastante curto, concentrações suficientes para provocar efeitos detectáveis. Assim sendo, os resultados da fase curta de superfusão sugerem que o glutamato muito rapidamente atinja os terminais dos interneurônios excitatórios das camadas superficiais, produzindo nessa região um estado facilitatório nas sinapses locais. Essa facilitação pode ocorrer tanto a nível dos terminais de interneurônios excitatórios como a nível de terminais recorrentes das próprias células piramidais cujos corpos celulares se localizam em camadas corticais mais profundas.

Os efeitos provocados pela micro-injeção de glutamato, semelhantes e mais intensos do que aqueles induzidos pelo aspartato, indicam, também, uma forte ação facilitadora a nível dos terminais das fibras talâmicas do sistema sensorial específico. Obviamente nossos experimentos não permitem discernir qual seria a ação específica de cada um desses aminoácidos nessas sinapses, se teriam eles a função natural de neurotransmissores verdadeiros ou de neuromoduladores. É possível que ambos participem como neurotransmissores nas mesmas sinapses, que sejam ambos neuromoduladores ou, ainda, que cada um deles exerça uma dessas duas funções.

Assim sendo, nossos estudos, além de demonstrar claramente o possível envolvimento do aspartato e do glutamato na

transmissão sináptica a nível do córtex cerebral do rato, sugerem amplas áreas de estudo para a compreensão desse fenómeno, como por exemplo a utilização de agonistas e antagonistas, a aplicação microiontoforética destes e dos próprios aminoácidos e experimentos com substâncias marcadas.

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1- Foram analisados os efeitos da superfusão da superfície pial do córtex cerebral do rato com solução salina 0,9% sobre a atividade eletrocorticográfica e os potenciais evocados induzidos por estimulação táctil.

2- Foram estudados os efeitos de séries curtas (10 minutos) e longas (90 minutos) de superfusão do córtex cerebral com os ácidos glutâmico e aspártico sobre os potenciais evocados da região somato-sensorial induzidos por estimulação táctil da pata anterior contralateral.

3- Foram investigados, também, os efeitos provocados, sobre os potenciais mencionados, de micro-injeções de ácido glutâmico, ácido aspártico e solução salina 0,9% no interior do córtex cerebral, à profundidade de 0,75mm.

4- Nenhuma alteração foi detectada, quer no registro eletrocorticográfico quer nos potenciais evocados, durante a superfusão prolongada (90 minutos) do córtex com solução salina 0,9%.

5- A superfusão cortical com ácido aspártico não produz alterações nas amplitudes dos potenciais evocados durante os primeiros 10 minutos, provocando, porém, uma diminuição estatisticamente significativa, tanto no componente P1 como no N1

em tempos superiores a esse.

6- O ácido glutâmico induz aumentos estatisticamente significativos nos componentes P1 e N1 dos potenciais evocados, tanto durante superfusão de curta (10 minutos) como de longa (90 minutos) duração.

7- A micro-injeção de ácido aspártico em camadas corticais profundas induz aumentos estatisticamente significativos, em todos os tempos na amplitude do componente P1 mas não naquela da onda N1, dos potenciais evocados, sendo significativa a alteração desta apenas aos 10 minutos após a administração do aminoácido.

8- A micro-injeção de ácido glutâmico em camadas corticais profundas provoca sempre aumentos estatisticamente significativos nos componentes P1 e N1 dos potenciais evocados, enquanto que nenhuma alteração é induzida pela micro-injeção de solução salina 0,9%.

9- Os resultados do presente trabalho, embora não possam indicar com precisão os locais onde os aminoácidos estudados estariam atuando, quer como neurotransmissores quer como neuromoduladores, sugerem uma possível participação do ácido glutâmico na transmissão a nível das sinapses entre as fibras talâmicas do sistema específico e as células piramidais das camadas III e IV e do ácido aspártico nas sinapses formadas pelos axônios das células piramidais dessas camadas e os neurônios com os quais eles fazem contato.

?

## BIBLIOGRAFIA

- Amassian, V. E. & Weiner, H. (1966). "Monosynaptic and polysynaptic activation of pyramidal tract neurons by thalamic stimulation". *In* The Thalamus (D.P. Purpura and M. D. Yahr, eds.). New York: Columbia University Press. pp. 255-282.
- Angel, A. (1977). "Processing of sensory information". *Progr. Neurobiol.*, 9:1-177.
- Angel, A.; Gratton, D. A.; Halsey, M. J. & Warley-Smith, B. (1980). "Pressure reversal of the effect of urethane on the evoked somatosensory cortical response in the rat". *Brit. J. Pharmacol.*, 70:241-247.
- Assumpção, J. A.; Bernardi, N.; Brown, J. & Stone, T. W. (1979). "Selective antagonism by benzodiazepines of neuronal responses to excitatory amino acids in the cerebral cortex". *Br. J. Pharm.*, 67:563-568.
- Abe, T.; Hariya, Y.; Kawai, N. & Miwa, A. (1989). "Comparative study of amino acid composition in an extract from hornet venom sacs: high content of neuroactive amino acid in *Vespa*". *Toxicon.*, 27(6):683-688.
- Balcar, V. J. & Johnston, G. A. R. (1973). "High affinity uptake of transmitters: studies on the uptake of L-aspartate, GABA, L-glutamate and glycine in cat spinal cord". *J. Neurochem.*, 20:529-539.
- Balcar, V. J.; Borg, J. & Mandel, P. (1977). "High affinity uptake of L-aspartate and L-glutamate by glial cell". *J. Neurochem.*, 28:87-93.
- Bandler, R.; Depaulis, A. & Vergnes, M. (1985). "Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids". *Behav. Brain Res.*, 15: 107-119.

- Battistin, L.; Grynbaum, A. & Lajtha, A. (1969).  
 "Distribution and uptake of amino acids in various regions of the cat brain *in vitro*".  
J. Neurochem., 16:1459-1468.
- Bazemore, A. W.; Elliott, K. A. C. & Florey, E. (1957).  
 "Isolation of factor I". J. Neurochem., 1:334-339.
- Beal, M. F.; Walker, L. C.; Swartz, K. J.; Casanova, M. F. & Price, D. L. (1988). "Developmental changes of neuropeptides and amino acids in baboon cortex".  
Brain Res. Dev. Brain Res., 44(1):156-159.
- Behbehani, M. M. & Fields, H. L. (1979). "Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia". Brain Res., 170:85-93.
- Bennett, J. P. Jr.; Longan, W. J. & Snyder, S. H. (1973).  
 "Amino acids as central nervous transmitters. The influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamate and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat". J. Neurochem., 21:1533-1550.
- Bernardi, N. (1979). "A Study on the Release of Transmitter Candidates From the In Vivo Rat Cerebellar Cortex"  
 Ph.D. Thesis, University of Aberdeen, Scotland.
- Bernardi, N. (1982). "Possible involvement of glutamate in electrocortical activity". Neuropharmacology, 21: 937-939.
- Bernardi, N. (1987). "Participação de amino-ácidos neurotransmissores em sistemas responsáveis pelo alerta neocortical". Tese apresentada para provimento do cargo de Professor Titular. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Berger, S. J.; Cater, J. G. & Lowry, O. H. (1977). "The distribution of glycine, GABA, glutamate and aspartate in rabbit spinal cord, cerebellum and hippocampus".  
J. Neurochem., 28:149-158.



- Blasberg, R. & Lajtha, A. (1966). "Heterogeneity of the mediate transport system of amino acid uptake in brain". Brain Res., 1:86-104.
- Bradford, H.F. (1969). "Respiration *in vitro* of synaptosomes from mammalian cerebral cortex". J. Neurochem., 16: 675-684.
- Bradford, H. F. (1970). "Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: release of amino acid". Brain Res., 19:239-247.
- Bradford, H. F. (1986). Chemical Neurobiology. An Introduction to Neurochemistry. New York, W. H. Freeman and Company.
- Bradford, H. F. (1977). "The metabolic and transmitter-releasing properties of isolated nerve-terminals". In: Synapses, ed. Cottrell, G. A. and Usherwood, P. R. N., pp. 21-35, Glasgow, Blackie & Sons Ltd.
- Bradford, H. F. & Ward, H. K. (1976). "On glutaminase activity in mammalian synaptosomes". Brain Res., 110:115-125.
- Bradford, H. F.; Ward, H. K. & Thomas, A. J. (1978). "Glutamine- a major substrate for nerve endings". J. Neurochem., 30:1453-1459.
- Brodal, A. (1981). "Neurological Anatomy". 3rd ed. New York; Oxford University Press.
- Busija, D. W. & Leffler, C. W. (1989). "Dilator effects of amino acid neurotransmitters on piglet pial arterioles". Am. J. Physiol., 257(4 PF2): H1200-1203.
- Cajal, S. R. (1911). "Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme & des Vertébrés". L. Azoulay (trans.), Vol 2, Paris: Maloine, Republished in 1955. Madrid: Instituto Ramon y Cajal.

- Carlson, H. E.; Miglietta, J. T. Roginsky, M. S. & Stegink, L.D. (1989). "Stimulation of pituitary hormone secretion by neurotransmitter amino acids in human". Metabolism, 38(12):1179-1182.
- Carobrez, A. P.; Krieger, J. E.; Aguiar, J. C. & Graeff, F. G. (1985). "Antagonismo pelo dietil ester de glutamato (GDEE) da reação de defesa produzida pela microinjeção de ácido glutâmico na substância cinzenta periaquedutal dorsal do rato". XX Congresso da SBFis, São Paulo, pp. 97.
- Carpenter, M. B. (1976). "Human Neuroanatomy". 7th ed. Baltimore; Williams & Wilkins.
- Chandler, S. H. (1989). "Evidence for excitatory amino acid transmission between mesencephalic nucleus of V afferents and jaw-closer motoneurons in the guinea pig". Brain Res., 477(1-2):252-264.
- Choi, D. W. & Fischbach, G. D. (1981). "GABA conductance of chick spinal cord and dorsal ganglion neurons in cell culture". J. Neurophysiol., 45:605-620.
- Chujo, T.; Yamada, Y. & Yamamoto, C. (1975). "Sensitivity of Purkinje cell dendrites to glutamic acid". Exp. Brain Res., 23:293-300.
- Clark, R. M. & Collins, G. G. S. (1976). "The release of endogenous amino acid from the rat visual cortex". J. Physiol., 262:383-400.
- Collins, G. G. S. (1977a). "On the role of taurine in the mammalian central nervous system. In: Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology, ed. Youdin, M. B. H.; Lovenberg, W.; Sharman, D. F. & Lagnado, J. R., Vol. 1, pp. 43-72, London, John Wiley & Sons.
- Collins, G. G. S. (1977b). "The release of endogenous amino acid from the rat visual cortex by calcium ions in the presence of calcium ionophores X537A and A23187". J. Neurochem., 28:461-463.

- Cotman, C. W. & Hamberger, A. (1978). "Glutamate as a CNS neurotransmitter: properties of release, inactivation and biosynthesis". In: Amino acids as Chemical Transmitters, ed. Fonnum, F., pp. 379-412, New York, Plenum Press.
- Creutzfeldt, O. D.; Watanabe, S. & Lux, H. D. (1966). "Relations between EEG phenomena and potentials of single cortical cell (pars 1 and 2). Elektroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 20:1.
- Curtis, D. R. & Johnston, G. A. R. (1975). "Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system". Ergeb. Physiol., 69:97-188.
- Curtis, D. R. & Watkins, J. C. (1960). "The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids". J. Neurochem., 6:117-141.
- Curtis, D. R. (1989). "Amino acid neuromediators". Farmakol. Toksikol., 52(6):4-18.
- Cutler, R. W. T. & Dudzinski, D. S. (1974). "Regional changes in amino acid content in developing rat brain". J. Neurochem., 23:1005-1009.
- Cutler, R. W. T. & Dudzinski, D. S. (1975). "Release of [<sup>3</sup>H] GABA and [<sup>14</sup>C] glutamic acid from rat slices: the relationship between the tissue pool size and rates of spontaneous and electrically induced release". Brain Res., 88:415-423.
- Davidson, N. (1976). "Neurotransmitter Amino Acids". London, Academic Press.
- Davis, R. & Huffman, R. D. (1969). "Pharmacology of the brachium conjunctivum-red nucleus synaptic system in the baboon". Fedn. Proc., 28:775.
- Davison, A. N. & Kaczmarek, L. K. (1971). "Taurine - a possible neurotransmitter?". Nature, 234:107-108.

- De Belleruche, J. S. & Bradford, H. F. (1973). "Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal". J. Neurochem., 21:441-451.
- Debler, E. A. & Lajtha, A. (1987). "High-affinity of gamma-aminobutyric acid, glycine, taurine, L-aspartate acid and L-glutamic acid in synaptosomal (P2) tissue: a kinetic and substrate specificity analysis. J. Neurochem., 48(6):1851-1856.
- De Montigny, C. & Lund, J. P. (1980). "A microiontophoretic study of the action of kainic acid and putative neurotransmitters in the rat mesencephalic trigeminal nucleus". Neuroscience, 5:1621-1628.
- Di Lauro, A.; Meek, J. L. & Costa, E. (1982). "Specific high affinity of L-<sup>3</sup>H-aspartate to rat brain membranes". J. Neurochem., 38:1261-1267.
- Donzanti, B. A. & Ung, N. Y. (1990). "Alterations in neurotransmitter amino acid content in the aging rat striatum are subregion dependent". Neurobiol. Aging, 11(2):159-162.
- Dunlop, J.; Mason, H.; Grieve, A. & Griffiths, R. (1989). "Excitatory sulphur amino acid-evoked neurotransmitter release from rat brain synaptosome fraction". J. Neural Transm. Gen. Sect., 78(3):195-208.
- Durkin, T. A.; Anderson, G. M. & Cohen, D. J. (1988). "High-performance liquid chromatographic analysis of neurotransmitter amino acids in brain". J. Chromatogr., 428(1):9-15.
- Erecinska, M. (1989). "Stimulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity during eletrogenic uptake of acidic amino acid transmitters by rat brain synaptosomes". J. Neurochem., 52(1):135-139.
- Erecinska, M. & Nelson, D. (1987). "Amino acid neurotransmitters in the CNS. Relationships between net uptake and exchange in the rat brain synaptosomes. FEBS Lett., 213(1):61-66.

- Erecinska, M.; Pastuszko, A.; Wilson, D. F. & Nelson, D. (1987). "Ammonia-induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes: differences between the effects on amine and amino acids". *J. Neurochem.*, 49(4):1258-1265.
- Erecinska, M. & Troeger, M. B. (1986). "Amino acid neurotransmitters in the CNS. Characteristics of the acidic amino acid exchange". *FEBS Lett.*, 199(1): 95-99.
- Fagg, G. E. & Lane, J. D. (1979). "The uptake and release of putative amino acid neurotransmitters". *Neuroscience*, 4:1015-1036.
- Florey, E. (1954). "An inhibitory and excitatory factor of mammalian central nervous system, and their action on a single sensory neuron". *Arch. Int. Physiol.*, 62:33-53.
- Fonnum, F. & Malthe-Sorensen, D. (1981). "Localization of glutamate neurons". In: *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System*, ed. Roberts, P. J.; Storm-Mathisen, J. & Johnston, G. A. R., New York, John Wiley & Sons, pp. 205-222.
- Fonnum, F. & Paulsen, R. E. (1990). "Comparison of transmitter amino acid levels in rat globus pallidus and neostriatum during hypoglycemia or after treatment with methionine sulfoximine or gamma-vinyl gamma-aminobutyric acid". *J. Neurochem.*, 54(4):1253-1257.
- Foster, A. C. & Fagg, G. E. (1984). "Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptor". *Brain Res. Reviews*, 7:103-164.
- Fujita, K. & Nagata, Y. (1989). "Effects of dorsal root section and occlusion of dorsal spinal artery on the neurotransmitter candidates in rat spinal cord". *Neurochem. Res.*, 14(5):399-404.

- Gahwiler, B. H. (1976). "Spontaneous bioelectric activity of cultured Purkinje cells during exposure to glutamate, glycine and strychnine". J. Neurobiol., 7:97-107.
- Galindo, A.; Krnjevic, K. & Schwartz, S. (1967). "Micro-iontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus". J. Physiol., 192:359-377.
- Geller, H. N. & Woodward, D. J. (1974). "Responses of cultured cerebellar neurons to iontophoretically applied amino acid". Brain Res., 74:67-80.
- Graham, L. T., Jr.; Shank, R. P.; Werman, R. & Aprison, M. H. (1967). "Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, alfa-aminobutyric acid, glycine and glutamine". J. Neurochem., 14:465-472.
- Graham, S. H.; Shiraishi, K.; Panter, S. S.; Simon, R. P. & Faden, A. I. (1990). "Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia". Neurosci. Lett., 110(1-2):124-130.
- Gross, G.; Huber, G.; Klosterkötter, J.; Rao, M. L. & Linz, M. (1990). "Status-dependent neurochemical parameters in schizophrenic and affective diseases". Fortschr. Neurol. Psychiatr., 58(4):154-160.
- Guidotti, A.; Badiani, G. & Papeu, G (1972). "Taurine distribution in cat brain". J. Neurochem., 19:431-435.
- Hamberger, A.; Sellstrom, A. & Weiler, C. T. (1978). "Glial cells and amino acid transmitters". In: Amino Acids as a Chemical transmitters, ed. Fonnum, F., pp. 653-662, New York, Plenum Press.
- Harrison, N. L. & Simmonds, M. A. (1985). "Quantitative studies on some antagonists of N-methyl-D-aspartate in slices of rat cerebral cortex." Brit. J. Pharmacol., 84:381-391.

- Hayashi, T (1954). "Effects of sodium glutamate on the nervous system". Keio J. Med., 3:183-192.
- Headley, P. M. & Grillner, S. (1990). "Excitatory amino acid and synaptic transmission: the evidence for a physiological function". Trends Pharmacol. Sci., 11(5): 205-211.
- Hillered, L.; Persson, L.; Ponten, U. & Ungerstedt, U. (1990). "Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis". Acta Neurochir. (Wien), 102(3-4):91-97.
- Holopainen, I & Kontro, P. (1990). "D-aspartate release from cerebellar astrocytes: modulation of the high K-induced release by neurotransmitter amino acid". Neuroscience, 36(1):115-120.
- Huether, G. (1989). "Amino acid availability and brain development: effects of nutritional and metabolic inadequacies". Eur. J. Clin. Nutr., 43 Suppl 1: 19-25.
- Iversen, L. L.; Mitchell, J. F. & Srinivasan, V. (1971). "The release of alfa-aminobutyric acid during inhibition in the cat visual cortex". J. Physiol., 212:519-534.
- Iversen, L. L. & Neal, M. J. (1968). "The uptake of [ $^3$ H]GABA by slices of rat cerebral cortex". J. Neurochem., 15: 1141-1149.
- Jasper, H. H. & Koyama, I. (1969). "Rate of release of amino acids from the cerebral cortex in the cat as effected by brainstem and thalamic stimulation". Can. J. Physiol. Pharm., 47:889-905.
- Jasper, H. H.; Khan, R. T. & Elliott, K. A. C. (1965). "Amino acids released from the cerebral cortex in relation to its state of activation". Science, 147:1448-1449.

- Jones, E. G. & Powell, T. P. S. (1973). "Anatomical organization of the somatosensory cortex". In: A. Iggo (ed.), Handbook of Sensory Physiology, Vol 2, The Somatosensory system. New York: Springer, pp. 579-620.
- Jones, I. M.; Jordan, C. C.; Morton, I. K. M.; Stagg, C. J. & Webster, R. A. (1973). "Chronic dorsal root section on free amino acid levels in the rabbit spinal cord". Br J. Pharmac., 47:668-669P.
- Kaczmarek, L. K. & Adey, W. R. (1975). "Factors affecting the release of [ $^{14}\text{C}$ ]taurine from cat brain: the electrical effects of taurine on normal and seizure prone cortex". Brain Res., 76:83-94.
- Kapetanovic, I. M.; Yonekawa, W. D. & Kupferberg, H. J. (1990). "Use of stable isotopes and gas chromatograph-mass spectrometry in the study of different pools of neurotransmitter amino acids in the brain slices". J. Chromat., 500:387-394.
- Kawamura, H. & Provini, L. (1970). "Depression of cerebellar Purkinje cells by microionophoretic application of GABA and related amino acids". Brain Res., 24:293-304.
- Kitsikis, A. & Steriade, M. (1981). "Immediate behavioral effects of kainic injections into the midbrain reticular core". Beh. Brain Res., 3:361-380.
- Krieg, W. J. S. (1946). "Connections of the cerebral cortex -I. the albino rat - topograph of the cortical areas". J. Comp. Neurol., 84:221-275.
- Krnjevic, K. & Phillis, J. W. (1963). "Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex". J. Physiol., 165:274-304.
- Levi, G. & Raiteri, M. (1989). "Neurotransmitter amino acid release from synaptosomes". J. Neurochem., 53(4):1324-1326.



- Li, C. L.; Cullen, C. & Jasper, H. H. (1956). "Laminar microelectrode studies of specific somatosensory cortical potentials". *J. Neurophysiol.*, 19:111-113.
- Logan, W. J. & Snyder, S. H. (1971). "Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acid and aspartic acids in central nervous tissue in rat". *Nature*, 234:297-299.
- Lorente de Nó, R. (1922). "La corteza cerebral del ratón (Primera Contribución - La Corteza Acustica). Trab. Lab. Invest. Biol. Madr.", 20:41-78.
- Lorente de Nó, R. (1938). "Synaptic stimulation of motoneurons as a local process". *J. Neurophysiol.*, 1:195-206.
- Maes, M.; Vandewoude, M.; Maes, L.; Schotte, C. & Cosyns, P. (1989). "A revised interpretation of TRH test results in female depressed patients. Part II: Prolactin responses. Relationships with sex hormones, corticosteroid state, age, monoamines and amino acid levels". *J. Affective Disord.*, 16(2-3):215-221.
- MacKay, D. M. (1970). "Evoked brain potentials as indicator of sensory information processing". *Neurosci. Res. Symp. Summ.*, 4:397-411.
- Martiniak, J.; Chavko, M.; Danielisov, V. & Marlala, J. (1989). "Regional Concentration of transmitter amino acids after spinal cord ischaemia in rabbit". *Physiol. Bohemoslov.*, 38(3):275-281.
- Masiello, P.; Balestreri, E.; Bacciola, D. & Bergamini, E. (1987). "Influence of experimental diabetes on brain levels of monoamine neurotransmitters and their precursor amino acids during tryptophan loading". *Acta Diabetol. Lat.*, 24(1):43-50.
- Maycox, P. R.; Hell, J. W. & Jahn, R. (1990). "Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles". *Trends Neurosci.*, 13(3):83-87.

- Mayer, M. L. & Westbrook, G. L. (1986). "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrates central nervous system". Prog. Neurobiol., 28:197-276.
- McBride, W. J.; Aprison, M. H. & Kusano, K. (1976). "Contents of several amino acids in the cerebellum, brain stem and cerebrum of the "staggerer", "weaver" and "nervous" neurologically mutant mice". J. Neurochem., 26:867-870.
- McLennan, H. (1976). "The autoradiographic localization of L-[<sup>3</sup>H]glutamate in the rat brain tissue". Brain Res., 113:139-144.
- Meddis, R. (1975). Statistical Handbook for Non-Statisticians. London, McGraw-Hill Book Company Ltd.
- Meyer, K. H. & Veh, R. W. (1989). "Antibodies against neuroactive amino acids and neuropeptides. A new two-step-procedure for the preparation of carrierprotein linked amino compounds". Acta Histochem. Suppl. (Jena), 37:187-188.
- Morimoto, B. H. & Koshland, D. E. Jr. (1990). "Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87(9):3518-3521.
- Mountcastle, V. B. (1976). "The world around us: neural command function for selective attention". Neurosci. Res. Program Bull., 14:suppl.
- Mulder, A. H. & Snyder, S. H. (1974). "Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat". Brain Res., 76:297-308.
- Neal, M. J. & Bowery, N. G. (1979). "Differential effects of veratridine and potassium depolarization on neuronal and glial GABA release". Brain Res., 167:337-343.

- Negrão, N. (1967). "Ciclos de sono, fusos de sono natural e anestésico e potenciais de recrutamento no rato". Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da USP.
- Nicoll, R. A. (1971). "Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb". Brain Res., 35:137-149.
- Nieoullon, A. (1990). "Les acides amines excitateurs, neuromédiateurs du système nerveux central". Thérapie, 45(3):281-285.
- Nistri, A. & MacDonald, J. F. (1978). "Quantitative studies of iontophoretically applied excitatory amino acids". In: Amino Acids as Chemical Transmitters, Ed Fonnum, F., New York, Plenum Press, pp. 87-91.
- Nogueira, G. J.; Argiz, C. A. G. & Levin, E. (1965). "Disappearance of different substance in contact with external surface of brain". Experientia, 21:734-735.
- Oja, S. S.; Kontro, P. & Lähdesmäki, P. (1977). "Amino acids as inhibitory neurotransmitters". Progress in Pharmacology, Vol. 1, No. 3:1-119.
- Oja, S. S. & Kontro, P. (1987). "Neurochemical aspects of amino acid transmitters and modulators". Med. Biol., 65(2-3):143-152.
- Onodera, K. & Takeuchi, A. (1990). "Amino acid and peptide as excitatory neurotransmitters". Tanpakushitsu Kakusan Koso., 35(4 suppl.):734-742.
- Osborne, R. H.; Bradford, H. F. & Jones, D. J. (1973). "Patterns of amino acid release from nerve-ending isolated from spinal cord medulla". J. Neurochem., 21:407-419.
- Ottersen, O. P. (1989). "Quantitative electron microscopic immunocytochemistry of neuroactive amino acids". Anat. Embriol. (Berl.), 180(1):1-15.

- Pasante-Morales, H.; Klethy, J.; Ledig, M. & Mandel, P. (1972). "Free amino acids of chicken and rat retina". Brain Res., 41:494-497.
- Paulsen, R. E.; Contestabile, A.; Villani, L. & Fonnum, F. (1988). "The effect of fluorocitrate on transmitter amino acid release from rat striatal slices". Neurochem. Res., 13(7):637-641.
- Paulsen, R. E. & Fonnum, F. (1989). "Role of glial cells for the basal and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$ -evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis". J. Neurochem., 52(6):1823-1829.
- Pogson, C. I.; Knowles, R. G. & Salter, M. (1990). "The control of aromatic amino acid catabolism and its relationship to neurotransmitter amine synthesis". Crit. Rev. Neurobiol., 5(1):29-64.
- Purpura, D. P. (1970). "Operations and processes in thalamic and synaptically relates neural subsystems". In:Schmidt, F. O., ed.: The Neuro Sciences. Second study program, New York, The Rockefeller Univ. Press.
- Reynolds, R. & Herschkowitz, N. (1986). "Selective uptake of neuroactive amino acids by both oligodendrocytes and astrocytes in primary dissociated culture: a possible role for oligodendrocytes in neurotransmitter metabolism". Brain Res., 371(2):253-266.
- Roberts, P. J. (1974). "Amino acid release from isolated rat dorsal root ganglia". Brain Res., 74:327-332.
- Roberts, P. J. & Keen, P. (1974 a). "Effect of dorsal root section on amino acids of rat spinal cord". Brain Res., 74:333-337.
- Roberts, P. J. & Keen, P. (1974 b). " $^{14}\text{C}$ glutamate uptake and compartmentation in glia of rat dorsal sensory ganglion". J. Neurochem., 23:201-209.

- Roberts, P. J. & Mitchell, J. F. (1972). "The release of amino acids from the hemisected spinal cord during stimulation". J. Neurochem., 19:2473-2481.
- Roberts, R. B.; Flexner, J. B. & Flexner, L. B. (1959). "Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis". J. Neurochem., 4:78-90.
- Rommelspacher, H. (1990). "Amino acids as activating neurotransmitters". Nervenarzt, 61(1):61-63.
- Rossi, S. T. & Bernardi, N. (1983). "Alterations of the cortical evoked potential by topical application of taurine". EEG Clin. Neurophysiol., 55:102-104.
- Rossi, S. T. & Bernardi, N. (1985). "Inhibitory amino acid effects upon cortical evoked potentials". An. Acad. Brasil. Ciênc., 57:111-113.
- Sandberg, M.; Hagberg, H.; Jacobson, I.; Karlsson, B.; Lehmann, A. & Hamberger, A. (1987). "Analysis of amino acids:neurochemical application". Life Sci., 41(7):829-832.
- Schlag, J. (1974). "Generation of brain evoked potentials". In: Thompson, R. F. & Patterson, M. M. ed., Methods in Physiological Psychology, I-A e I-B.
- Schwartz, J. H. (1980). "The transport of substances in nerve cells". Sci. Am., 242(4):152-171.
- Shank, R. P. & Aprison, M. H. (1970). "The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas in the rat central nervous system". J. Neurochem., 17:1461-1475.
- Shank, R. P. & Aprison, M. H. (1977). "Glutamine uptake and metabolism by the isolated toad brain: evidence pertaining to its proposed role as a transmitter precursor". J. Neurochem., 28:1189-1196.

- Shiota, A.; Hiramatsu, M. & Mori, A. (1989). "Amino acid neurotransmitters in iron-induced epileptic foci in the rat". Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 66(1): 123-133.
- Simler, S.; Ciesielski, L.; Clement, J. & Mandel, P. (1990). "Amino acid neurotransmitter alteration in three sublines of Rb mice differing by their susceptibility to audiogenic seizure". Neurochem. Res., 15(7):686-693.
- Singh, S. I. & Malhortra, C. L. (1962). "Amino acid content of monkey brain - I. General pattern and quantitative value of glutamic acid, glutamine, gamma-aminobutyric acid and aspartic acid". J. Neurochem., 9:37-42.
- Smialowski, A. (1978). "The effect of intrahippocampal administration of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)". In: Amino Acids as Chemical Transmitters, ed. Fonnum, F., New York, Plenum Press, pp. 177-180.
- Skilling, S. R.; Smullin, D. H. & Larson, A. A. (1990). "Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception". J. Neurosci., 10(4):1309-1318.
- Snyder, S. H. & Young, A. B. (1975). "The glycine synaptic receptor in the mammalian central nervous system". Br. J. Pharmacol., 53:473-484.
- Souza, F. P. (1980). "O Córtex Somato-sensorial da Cutia *Dasyprocta aguti* (E Sua Contribuição em Relação à Dor Pontada)". Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- Srinivasan, V.; Neal, M. J. & Mitchell, J. F. (1969). "The effect of electrical stimulation and high potassium concentration on the efflux of [ $^3$ H]gamma-aminobutyric acid from brain slices". J. Neurochem., 16:1235-1244.
- Stern, J. R.; Eggleston, L. V.; Hems, R. & Krebs, H. A. (1949). "Accumulation of glutamic acid in isolated brain tissue". Biochem. J., 44:410-418.

- Stone, T. W. (1973). "Cortical pyramidal tract interneurons and their sensitivity to L-glutamic acid". *J. Physiol.*, 233:211-225.
- Storm-Mathisen, J. (1977). "Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model". *Prog. Neurobiol.*, 90:119-181.
- Takayasu, M. & Dacey Jr., R. G. (1989). "Effects of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitters on isolated cerebral parenchymal arterioles". *Brain Res.*, 482(2):393-396.
- Tallan, H. H.; Moore, S. & Stein, W. H. (1954). "Studies on the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat". *J. Biol. Chem.*, 211:927-939.
- Tapia-Arancibia, L. & Astier, H. (1989). "Action of excitatory amino acid on somatostatin release from cortical neurons in primary cultures". *J. Neurochem.*, 53(4): 1134-1141.
- Tebécis, A. K. (1974). "Transmitters and Identified Neurons in the Mammalian Central Nervous System". Bristol, Sciencetechnica (Publishers) Ltd.
- Urca, G.; Nahin, R.L. & Liebeskind, J.C. (1980). "Glutamate-induced analgesia: Blockade and potentiation by naloxane". *Brain Res.*, 192:523-530.
- Van den Berg, C. J. (1970). "Compartmentation of glutamate metabolism in the developing brain: experiments with labelled glucose, acetate, phenylalanine, tyrosine and proline". *J. Neurochem.*, 17:973-983.
- Van den Berg, C. J.; Matheson, D. F. Ronda, G.; Rejnierse, G. L. A.; Blokhuis, G. G. D.; Kroon, M. C.; Clarke, D. D. & Garfinkel, D. (1975). "A model of glutamate metabolism in brain: a biochemical analysis of a heterogeneous structure". In: *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission*, ed. Berl, S.; Clarke, D. D. & Schneider, D., pp. 515-543.

- Varga, V.; Marnela, K.M.; Kontro, P.; Gulyds, J.; Vadsz, Z.; Lhdesmlki, P. & Oja, S. S. (1987). "Effects of acidic dipeptides on aminoacidergic neurotransmission in the brain". Adv. Exp. Med. Biol., 217:357-368.
- Veh, R. W.; Meyer, K. H.; Behringer, D. M.; Schlitz, C. R.; Petrasch, E. & Andres, K. H. (1989). "Antibodies against neuroactive amino acids and neuropeptides. Combination of acetylcholinesterase cytochemistry with immunocytochemical double staining techniques for the demonstration of GABA and glutamate like immunoreactivities in thalamus, hippocampus, cerebellar and cerebral cortex of the rat". Acta Histochem. Suppl. (Jena), 37: 189-190.
- Vivaldi, E.; McCarley, R. W. & Hobson, J. A. (1980). "Evocation of desynchronized sleep signs by chemical microstimulation of the pontine brain stem". In: The Reticular Formation Revisited, ed Hobson, J. A. & Brazier, M. A. B., New York, Raven Press, pp. 513-529.
- Zimmermann, M. (1978). "Neurophysiology of sensory system". In: R. F. Schmidt (ed.), Fundamental of Sensory Physiology. New York: Springer, pp. 31-80.
- Yakimova, K. & Ovtcharov, R. (1989). "Central temperature effects of the transmitter amino acid". Acta Pharmacol. Bulg., 15(3):50-54.
- Yingcharoen, K.; Rinvik, E.; Storm-Mathisen, J. & Ottersen, O. P. (1989). "GABA, glycine, glutamate, aspartate and taurine in the perihypoglossal nuclei: an immunocytochemical investigation in the cat with particular reference to the issue of the amino acid colocalization". Exp. Brain Res., 78(2):345-357.
- Young, A. B.; Oster-Granite, M. I.; Herndon, R. M. & Snyder, S. H. (1974). "Glutamic acid: selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum". Brain Res., 73:1-13.



- Walberg, F.; Ottersen, O. P. & Rinvik, E. (1990). "GABA, glycine, aspartate, glutamate and taurine in the vestibular nuclei: an immunocytochemical investigation in the cat". Exp. Brain Res., 79(3):547-563.
- Wafford, K. A. & Sattelle, D. B. (1986). "Effects of amino acid neurotransmitter candidates on an identified insect motoneurons". Neurosci Lett., 63(2):135-140.
- Watkins, J. C. & Evans, R. H. (1981). "Excitatory amino acid transmitters". Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21: 165-204.
- Wilson, J. E.; Wilkin, G. P. & Bazázs, R. (1976). "Metabolic properties of a purified preparation of large fragments of the cerebellar glomeruli: glucose metabolism and amino acid uptake". J. Neurochem., 26:957-965.
- Wright, P. M.; Nogueira, G. J.; & Levin, E. (1971). "Role of the pia mater in the transfer of substances in and out of the cerebrospinal fluid". Exp. Brain Res., 13: 294-305.
- White, H. L. (1981). "Glutamate as a precursor of GABA in rat brain and peripheral tissues". Molec. Cell. Biochem., 39:253-259.